

Aus dem Biochemischen Institut  
(Direktor: Prof. Dr. Stefan Rose-John)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**Die Metalloprotease Meprin beta ist eine  
Sheddase des *triggering receptor  
expressed on myeloid cells type 2*  
(TREM2)**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der Medizin  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

Dennis Kristopher Berner (geb. Duda)

Aus Kiel

Kiel, 2020

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly  
Biochemisches Institut
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Susanne Sebens  
Institut für Experimentelle Tumorforschung

Tag der mündlichen Prüfung: 22.09.2021

Zum Druck genehmigt: Kiel, den 10.05.2021

gez.: Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Metalloprotease Meprin beta ist eine Sheddase des *triggering receptor expressed on myeloid cells type 2* (TREM2)" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Kiel, den .....

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>i</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>iii</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>iv</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Limitierte Proteolyse.....	1
1.2 Meprin Metalloproteasen .....	2
1.3 <i>Triggering receptor expressed on myeloid cells type 2</i> .....	5
1.4 Morbus Alzheimer .....	6
1.5 Die Rolle der Metalloprotease Meprin beta in der Alzheimer-Erkrankung .....	8
1.6 Die Rolle des TREM2 in der Alzheimer-Erkrankung.....	9
1.7 Ziel der Arbeit.....	12
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
2.1 Material .....	13
2.1.1 Laborgeräte.....	13
2.1.2 Labor-/Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.3 Chemikalien.....	19
2.1.4 Puffer.....	19
2.1.5 Zellkultur .....	20
2.1.6 Mausstämme .....	21
2.1.7 Zelllinien .....	21
2.1.8 Plasmide.....	21
2.1.9 Antikörper .....	22
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 Zellkultur und Transfektion .....	24
2.2.2 Zellyse .....	24
2.2.3 Zellyse für die Membranfraktionierung.....	25
2.2.4 Fällung der Überstände mit Concanavalin A.....	25
2.2.5 SDS-PAGE und Western Blotting.....	25
2.2.6 Phagozytoseassay.....	26
2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence-activated cell scanning) .....	27
2.2.8 Immunfluoreszenz .....	27
2.2.9 <i>Ex-vivo</i> -Versuche .....	27
2.2.10 Präparation primärer muriner Makrophagen.....	28
2.2.11 Statistische Analyseverfahren .....	28

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>29</b>
3.1	TREM2 ist ein Substrat der Metalloprotease Meprin beta.....	29
3.1.1	TREM2 liegt als glykosyliertes Protein vor.....	29
3.1.2	Meprin beta spaltet TREM2 an der Zellmembran .....	30
3.1.3	Die rekombinante Ektodomäne des Meprin beta spaltet membrangebundenes TREM2 und sTREM2.....	32
3.1.4	Das Shedding des TREM2 durch Meprin beta beeinträchtigt die Phagozytose.....	34
3.1.5	Ko-Lokalisation von Meprin beta und TREM2 an der Zellmembran.....	38
3.2	TREM2 akkumuliert in primären Makrophagen aus Meprin beta <sup>-/-</sup> Mäusen .....	39
3.2.1	Meprin beta prozessiert TREM2 in primären murinen Makrophagen.....	39
3.2.2	Makrophagen aus Meprin beta <sup>-/-</sup> Mäusen haben eine erhöhte Phagozytosekapazität .....	41
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>42</b>
4.1	Meprin beta ist ein proteolytischer Regulator des TREM2.....	42
4.2	Ist das TREM2-Cleavage durch Meprin beta ein Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung? .....	45
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
<b>7</b>	<b>Anhänge .....</b>	<b>55</b>
7.1	Danksagung.....	55
7.2	Curriculum vitae .....	56

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Domänenstruktur von Meprin alpha und Meprin beta .....	3
Abbildung 2: Präferierte Spaltstellen von Meprin Metalloproteasen .....	4
Abbildung 3: TREM2 Struktur und Interaktionen .....	5
Abbildung 4: Amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung des APP .....	7
Abbildung 5: Prozessierung des APP durch Meprin beta .....	8
Abbildung 6: Punktmutationen in TREM2 .....	10
Abbildung 7: Fluoreszenzspektrum pHrodo <i>green</i> .....	26
Abbildung 8: Deglykosylierung und Darstellung von TREM2 im Western Blot .....	29
Abbildung 9: Ko-Transfektionen in HEK293T ADAM10/17 <sup>-/-</sup> Zellen.....	31
Abbildung 10: Rekombinantes Meprin beta spaltet sTREM2 .....	32
Abbildung 11: Inkubation von HEK293T ADAM 10/17 <sup>-/-</sup> Zellen mit rekombinanten Ektodomänen der Proteasen Meprin alpha, Meprin beta und ADAM 10 .....	33
Abbildung 12: Zeitreihe der Degradation des membrangebundenen TREM2 durch die rekombinante Ektodomäne des Meprin beta .....	34
Abbildung 13: Transfektion und Differenzierung von THP-1 Zellen. ....	35
Abbildung 14: FACS-Analyse des Phagozytoseassays mit <i>pHrodo green</i> (Thermo Scientific) in THP-1 Makrophagen.....	36
Abbildung 15: TREM2/DAP12 Fusionskonstrukte .....	37
Abbildung 16: Phagozytoseassay in HEK293T ADAM10/17 <sup>-/-</sup> mit TREM2/DAP12 .....	38
Abbildung 17: Ko-Immunfluoreszenz von Meprin beta/TREM2 in HEK293T ADAM10/17 <sup>-/-</sup> Zellen.....	39
Abbildung 18: TREM2 akkumuliert in BMDM aus Meprin beta Knockout-Mäusen .....	40
Abbildung 19: FACS-Analyse des Phagozytoseassays mit <i>pHrodo green</i> (Thermo Scientific).....	41

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Laborgeräte .....	13
Tabelle 2: Labor-/Verbrauchsmaterialien .....	17
Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Puffer.....	19
Tabelle 4: Verwendete Materialien für die Zellkultivierung .....	20
Tabelle 5: Mausstämme .....	21
Tabelle 6: Zelllinien.....	21
Tabelle 7: Plasmide.....	22
Tabelle 8: Primärantikörper .....	22
Tabelle 9: Antikörper Immunfluoreszenz .....	23

## Abkürzungsverzeichnis

$\mu$	Mikro
(v/v)	Volumenprozent
(w/v)	Massenprozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celcius
ADAM	<i>A disintegrin and metalloprotease domain containing protein</i>
Amp	Ampicillin
APP	<i>Amyloid-precursor-protein</i>
BACE-1	<i>Beta-site of APP cleaving enzyme</i>
BMDM	<i>Bone marrow-derived macrophages</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankung
$\text{CO}_2$	Kohlenstoffdioxid
CTFs	C-terminale Fragmente
ddH <sub>2</sub> O	doppelt destilliertes Wasser
Da	Dalton
DAPT	N-(N-(3,5-Difluorphenacetyl)-L-alanyl)-S-phenylglycine t-butyl ester
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	Echerichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>Extracellular-signal regulated kinases</i>
et al.	<i>et alii</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FTTC	Fluoresceinisothiocyanat

## Abkürzungsverzeichnis

g	Gramm
(x g)	<i>Units of times gravity</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-1-Ethansulfonsäure
HRP	<i>Horseradish-peroxidase</i>
HUPO	<i>Human Proteome Organisation</i>
Hygro	Hygromycin
IL	Interleukin
l	Liter
m	Meter, Milli
M	Molar, Mega
M-CSF	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute
mm	Millimeter
mV	Millivolt
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
MFU	<i>Mean fluorogenic units</i>
MMP's	<i>Matrix metalloproteinases</i>
MPS	Mononukleär-Phagozytäres System
n	Nano
One-Way ANOVA	<i>One-Way analysis of variance</i>
PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
r	Rekombinant
RIP	Regulierte Intramembranproteolyse
RNA	Ribonukleinsäure
SDS-(PAGE)	<i>Sodium dodecyl sulfate – (polyacrylamide gel electrophoresis)</i>
TREM2	<i>Triggering receptor expressed on myeloid cells 2</i>
TBS (-T)	<i>TRIS-buffered saline (+Tween)</i>





# 1 Einleitung

Das Proteom ist definiert als die Gesamtheit aller Proteine, welche unter exakt definierten Bedingungen und zu einem bestimmten Zeitpunkt in einem Organismus vorliegen. Verglichen mit dem Genom, sind das Proteom und das Transkriptom hoch dynamisch und passen sich äußeren Gegebenheiten an. Als bildliche Veranschaulichung sei an dieser Stelle ein Beispiel genannt. Eine Raupe und der aus ihr entstehende Schmetterling besitzen das gleiche Genom, unterscheiden sich jedoch maßgeblich in ihrem Proteom. Selbes gilt für Kaulquappe und Frosch. Die Ausprägung physiologischer und pathologischer Phänotypen ist folglich nicht allein mit dem Genom zu begründen. Sie basiert auf einem Zusammenspiel, dessen Komplexität sich nur unter Zuhilfenahme der Bioinformatik ergründen lässt und noch viele Fragen offen lässt.

## 1.1 Limitierte Proteolyse

Proteasen sind Enzyme, welche in der Lage sind Peptidbindungen hydrolytisch zu spalten. Etwa 2% des menschlichen Genoms kodieren für 580 Repräsentanten dieser Enzymklasse (Puente *et al.*, 2005), was die Bedeutung der Proteolyse für den humanen Organismus reflektiert. Die meisten Proteasen werden proteolytisch inaktiv als Zymogene exprimiert. Nach der Abspaltung des Propeptids, welches meist das katalytische Zentrum der Proteasen maskiert, sind diese proteolytisch aktiv. Die exakte physiologische Funktion der Mehrheit dieser Proteasen ist weiterhin unbekannt. Alle Proteine unterlaufen einer posttranslationalen Modifikation durch Proteolyse, was die Unabdingbarkeit von Proteasen untermauert. In den vergangenen Jahren begann die Forschung sich verstärkt mit dem Proteom, somit mit allen Proteasen und deren Substraten auseinander zu setzen (Wilkins *et al.*, 1996). Übergeordnete Zusammenschlüsse aus Forschungsgruppen wie die *Human Proteome Organisation* (HUPO) arbeiten an der Entschlüsselung des gesamten Proteoms. Es wird unterschieden zwischen Proteasen welche eine hohe oder eine geringe Substratspezifität aufweisen. So weisen die vom Pankreas zum Proteinkatabolismus sezernierten Proteasen eine sehr geringe Substratspezifität auf und sind klar von hochspezifischen Proteasen abzugrenzen. Der Prozess der selektiven Spaltung einer Protease mit hoher Substratspezifität wird als limitierte Proteolyse bezeichnet. Die spezifische Spaltung der Ektodomäne eines membranständigen Proteins durch eine membranständige Protease wird als Ektodomänen-*Shedding* bezeichnet. Ein sehr gut charakterisiertes Substrat eines Shedding-Prozesses ist zum Beispiel das Amyloide Vorläufer Protein (APP).

## 1.2 Meprin Metalloproteasen

Meprin alpha und Meprin beta gehören zur Astacin-Familie der Proteasen und sind Zink-abhängige Endopeptidasen (Stöcker,W; Zwilling, 1995). Auf Grund ihrer phylogenetischen Beziehung zur Metzincin-Superfamilie teilen sie viele Eigenschaften mit den Matrix Metalloproteasen (MMPs) und A Disintegrin and Metalloprotease (ADAM) Proteasen. In allen Proteasen der Astacin-Familie findet sich ein konserviertes Zink-Bindungsmotiv, in welchem das Zink Ion im katalytischen Zentrum von drei Histidinen und einem Tyrosin koordiniert wird (Bond and Beynon, 1995). Meprin alpha und Meprin beta werden als stark glykosylierte Typ-I Transmembranproteine exprimiert und bilden Homodimere an der Zelloberfläche. Es sind Multidomänen Proteine bestehend aus einem N-terminalen Propeptid, einer katalytischen Domäne, einer MAM (meprin A5 protein tyrosine phosphatase  $\mu$ ) Domäne, einer TRAF (tumour-necrosis-factor-receptor-associated-factor) Domäne, einer EGF (epidermal growth factor)-like Domäne und einer Transmembrandomäne gefolgt von einem kurzen zytosolischen Rest (Abb. 1). Im Gegensatz zu Meprin beta besitzt Meprin alpha eine Spaltstelle für Furin in einer zusätzlich inserierten Domäne und wird sekretiert. Lösliches Meprin alpha bildet nicht-kovalent verbundene Oligomere bis zu einer Größe von 6.4MDa im Extrazellularraum (Bertenshaw, Norcum and Bond, 2003). Die Ektodomäne von Meprin beta kann an der Zellmembran von den Proteasen ADAM10 und ADAM17 gespalten werden und liegt im übrigen membranständig als Homodimer vor (Hahn *et al.*, 2003; Jefferson *et al.*, 2013).

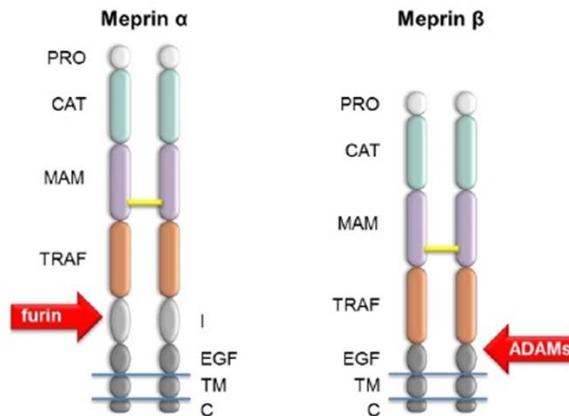


Abbildung 1:

**Domänenstruktur von Meprin alpha und Meprin beta.** Meprin Metalloproteasen sind Typ-I Transmembran Multidomänen Enzyme und über eine Disulfidbrücke zu Homodimeren verbunden. Durch Abspaltung des Propeptids werden sie katalytisch aktiv. Meprin beta liegt hauptsächlich membrangebunden vor, kann aber von ADAM Proteasen gescheddet werden. Meprin alpha kann via Spaltung durch Furin im Golgi-Apparat in den Extrazellularraum sekretiert werden. (Broder and Becker-Pauly, 2013)

Die ersten Identifizierungen von Meprin Metalloproteasen erfolgten im Gastrointestinaltrakt und in der Niere (Beynon, Shannon and Bond, 1981; Sterchi, Green and Lentze, 1982). In den vergangenen Jahren konnten Meprin alpha und Meprin beta in einer Reihe weiterer Gewebe, wie in der Haut (Becker-Pauly *et al.*, 2007; Kronenberg *et al.*, 2010) und im Hirn (Bien *et al.*, 2012) nachgewiesen werden. Seit der Entdeckung der Meprine in den frühen 1980er Jahren und ihrem ersten synthetischen Substrat, dem PABA-Peptid (N-benzol-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid), wurden diverse Substrate und Eigenschaften entdeckt. Durch die Hilfe moderner proteomischer Methoden wie dem TAILS (Terminal Amine Isotopic Labelling of Substrates) und dem PICS (Proteomic Identification of protease Cleavage Sites) konnte die Präferenz von Meprin beta und Meprin alpha für negativ geladene Aminosäuren in der P1'-Position ermittelt werden (Abb. 2). Diese Eigenschaft ist nahezu einzigartig für extrazelluläre Proteasen. Es lässt vermuten, dass alle Extrazellulärproteine, welche an einer negativ geladenen Aminosäure gespalten werden, höchstwahrscheinlich von Meprinen oder weiteren Familienmitgliedern der Astacine prozessiert werden.

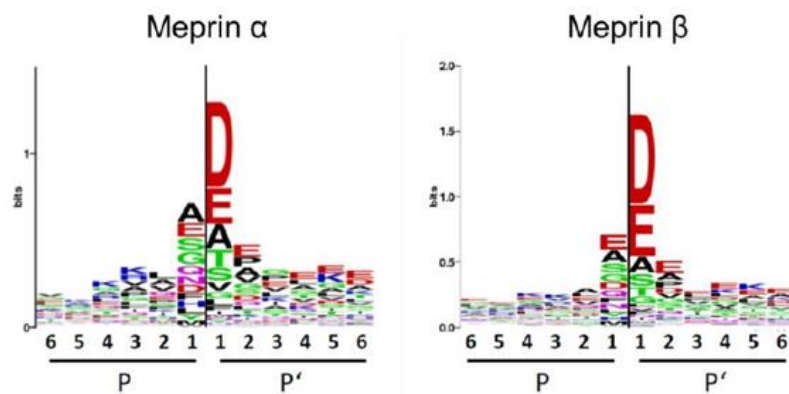


Abbildung 2:

**Präferierte Spaltstellen von Meprin Metalloproteasen.** In dieser WebLogo-Darstellung finden sich die von Meprin alpha und Meprin beta präferierten Aminosäuren von P6 zu P6' (Schechter and Berger, 1967) Farbgebung: Hydrophobe Reste (inklusive Alanin und Prolin) in schwarz, Polare Reste (inklusive Tyrosin und Glycin) in grün, positiv geladene Reste in blau und negativ geladene Reste in rot. (Becker-Pauly *et al.*, 2011)

Substrate für Meprin alpha und Meprin beta erstrecken sich über eine Reihe von Körperkompartimenten und lassen Rückschlüsse auf die Beteiligung von Meprin Metalloproteasen an diversen physiologischen Prozessen ziehen. So sind Meprin Metalloproteasen beispielsweise an der Reifung von Prokollagen I und III beteiligt und induzieren so die Formation von Kollagenfibrillen im Gewebe (Kronenberg *et al.*, 2010; Broder and Becker-Pauly, 2013; Prox, Arnold and Becker-pauly, 2015). Vor allem Meprin beta ist dafür bekannt die Ektodomänen seiner Substrate von der Zelloberfläche zu spalten. Eines dieser Substrate ist das Adhäsionsmolekül CD99, welches einen entscheidenden Einfluss auf die Transendotheliale Migration (TEM) beziehungsweise auf die Extravasation hat (Bedau *et al.*, 2017). Auch das Adhäsionsmolekül E-Cadherin wird von Meprin beta prozessiert wodurch die Zell-Zell-Interaktion geschwächt wird (Huguenin *et al.*, 2008). Meprin beta wird somit eine Rolle in der Migration von Tumorzellen, in fibrotischen Erkrankungen und auch in der Angiogenese zugeschrieben (Broder and Becker-Pauly, 2013). Meprin beta spaltet ebenfalls den IL-6-Rezeptor und generiert so den biologisch aktiven löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6R)(Arnold *et al.*, 2017). Das durch den sIL-6R vermittelte *Trans-Signalling* ist ein entscheidender pro-inflammatorischer Stimulus in Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen (CED) und der Neurodegeneration. Meprin Metalloproteasen konnten mit einer Reihe weiterer pathologischer Geschehen, wie Chronisch Entzündlicher Darmerkrankung (CED) (Banerjee *et al.*, 2009, 2011), Tumorgenese und Migration (Lottaz *et al.*, 2011) und Fibrose (Kronenberg *et al.*, 2010) in Verbindung gebracht werden.

### 1.3 *Triggering receptor expressed on myeloid cells type 2*

Der *Triggering Receptor expressed on myeloid cells Type 2* (TREM2) ist ein extrazellulärer Rezeptor des unspezifischen Immunsystems. Er findet sich in myeloiden Zelllinien wie Dendritischen Zellen und residenten Gewebemakrophagen. TREM2 wird exprimiert als stark glykosyliertes Typ-1 Transmembranprotein bestehend aus einer extrazellulären Immunoglobulin (Ig)-Domäne vom V-Typ gefolgt von einer kurzen Stalk-Region (Abb. 3). Diese geht in eine einzelne Transmembran-Helix über, welche mit dem *DNAX-activation protein 12* (DAP12, auch bekannt als TYROBP) interagiert und so das *Downstream-Signalling* induzieren kann. TREM2 endet mit einem C-terminalen zytosolischen Rest, welcher keine eigenen *Signalling*- oder *Trafficking*-Motive enthält (Colonna and Wang, 2016).

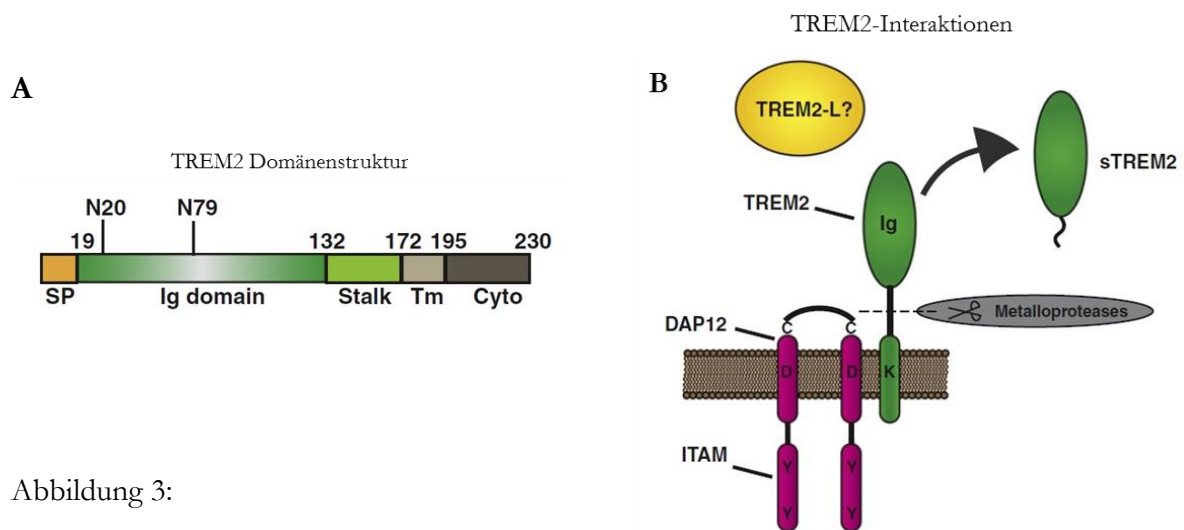


Abbildung 3:

**TREM2 Struktur und Interaktionen.** (A) Schematische Darstellung der TREM2-Domänenstruktur. SP=Signalpeptid, Ig=Immunoglobulin, Tm=Transmembran, Cyto=Cytosolischer Rest. N20 und N79 verweisen auf die Asparagine, an denen die Glykosylierungen verknüpft sind. Zahlen verweisen auf die jeweilig angrenzenden Aminosäuren am Übergang einer Domäne. (B) TREM2-Interaktionen. TREM2 besitzt eine einzelne Transmembran-Helix, welche über polare Interaktionen der Transmembrandomänen mit DAP12 interagiert. DAP12 existiert als Homodimer, welches über eine Disulfidbrücke verbunden ist. Jedes Monomer enthält eine *Immunoreceptor tyrosine-based activation motif* (ITAM)-Domäne. TREM2 besitzt eine Ig-Domäne um mit Liganden zu interagieren. Durch Ektodomänen-Shedding des TREM2 in der Stalk-Region wird das lösliche TREM2 (sTREM2) freigesetzt. (Kober and Brett, 2017)

TREM2 wird mit einem weiten Spektrum an Funktionen in Verbindung gebracht. Hierzu zählen Zelldifferenzierung und ihre Überlebensdauer, Proliferation, Aktivierung und Beeinflussung der Phagozytose (Colonna and Wang, 2016; Mazaheri *et al.*, 2017). Auch die Inflammation wird von

TREM2 reguliert, wie unter anderem durch eine negative Regulierung des *Toll-like Receptor* (TLR)-Pathways (Orr and McVicar, 2011). So weit wie das Spektrum der Funktionen reicht, desto größer noch scheint die Diversität möglicher Liganden zu sein. Seit der Entdeckung des TREM2 ließen sich noch keine eindeutigen endogenen Liganden identifizieren. Es ist jedoch ein Muster zu verzeichnen, welches auf anionische und lipidartige Liganden hindeutet (Daws *et al.*, 2003; Charles *et al.*, 2008; N'Diaye *et al.*, 2009). Die lösliche Ektodomäne des TREM2 (sTREM2) kann über *Shedding* der Ektodomäne (Wunderlich *et al.*, 2013; Kleinberger *et al.*, 2014) oder über alternatives Splicing generiert werden (Jin *et al.*, 2014). TREM2 ist ein Substrat für die regulierte Intramembranproteolyse (RIP). Nach dem *Shedding* der Ektodomäne durch Proteasen der ADAM- und BACE-Familie wird das verbleibende C-terminale membrangebundene Fragment von der  $\gamma$ -Sekretase prozessiert (Wunderlich *et al.*, 2013). Welche explizite Protease für dieses Shedding im humanen Zentralnervensystem verantwortlich ist, bleibt weiterhin ungeklärt. Für das sTREM2 wird ebenfalls ein Signalling diskutiert. Nach Zugabe des sTREM2 in Überstände von *bone marrow derived macrophages* (BMDM) zeigte sich eine ERK und MAPK14 Aktivierung (Wu *et al.*, 2015). Die Substitution von sTREM2 steigerte in einem weiteren Versuch die Transkription proinflammatorischer Zytokine in Mikroglia über Aktivierung des NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells) und verlängerte gleichzeitig die Überlebensdauer der Zellen (Zhong, X. F. Chen, *et al.*, 2017). Des Weiteren wird dem sTREM2 im Liquor cerebrospinalis eine Rolle als Biomarker für Neurodegenerative Erkrankungen zugeschrieben (Suárez-calvet *et al.*, 2016).

## 1.4 Morbus Alzheimer

„Ich habe mich sozusagen selbst verloren.“ Diesen Satz wiederholte die 51-jährige Auguste Deter immer wieder während ihrer Anamnese durch den deutschen Neuropathologen Alois Alzheimer im Jahr 1901. Sie war von der „Krankheit des Vergessens“ betroffen. Die histopathologische Untersuchung ihres Hirnes wenige Jahre später zeigte einen auffälligen Befund. Die gesamte Hirnrinde war durchsetzt von Ansammlungen abgestorbener Neuronen und Eiweiß-Plaques. Es sind über 100 Jahre vergangen, geprägt von enormen Fortschritten in der Medizin. Doch auch heute lässt der Stand der Wissenschaft nur Hypothesen über die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung zu.

Weltweit sind etwa 60% der 24 Millionen Demenzerkrankungen auf die Alzheimer-Erkrankung zurückzuführen (Ferri *et al.*, 2005). Je nach Eintrittsalter unterscheidet man zwischen einer präsenilen (vor dem 65. Lebensjahr) und einer senilen Demenz (nach dem 65. Lebensjahr). Im

englischen Sprachgebrauch sind diese Formen bekannt als *Early-* und *Late-onset-Alzheimer's disease* (EOAD, LOAD). Demenzielle Erscheinungen in der Alzheimer-Erkrankung zählen zu einer sogenannten primären Demenz, die darauf beruht, dass die kognitiven Verluste direkt auf Veränderungen des Hirnparenchyms zurückzuführen sind. Die Forschung der vergangenen Jahre fokussierte sich zuvorderst auf das Amyloide Vorläufer Protein (APP). Durch die Prozessierung des APP können A $\beta$ -Plaques entstehen, welche von der überwiegenden Mehrheit der an der Alzheimer-Forschung beteiligten Arbeitsgruppen als wesentliche Pathologie der Alzheimer-Erkrankung betrachtet werden. Evident hierfür ist das vermehrte frühe Auftreten einer EOAD bei Menschen mit einer Trisomie 21. Diese tragen drei Kopien des Chromosom 21, auf welchem das APP kodiert ist. Die Proteolytische Prozessierung des APP an der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Sekretase Spaltstelle führt zur Generierung des Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), welches sehr anfällig für Aggregation ist und so für den Untergang von Neuronen in Patienten mit Alzheimer Erkrankung verantwortlich gemacht wird. Wird das APP jedoch zunächst von einer  $\alpha$ -Sekretase, wie ADAM10, prozessiert, kommt es nicht zu der Generierung des neurotoxischen A $\beta$  (Abb. 4).

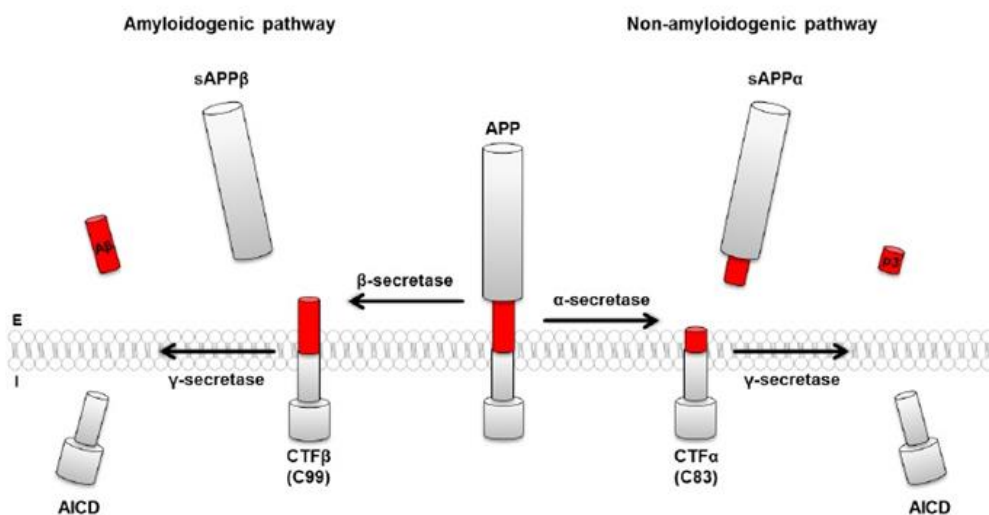


Abbildung 4:

**Amyloidogene und nicht-amyloidogene Prozessierung des APP.** Zur linken Seite der Abbildung ist der amyloidogene Weg der APP-Prozessierung dargestellt. Nach Prozessierung des APP an der  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle durch  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme (BACE-1) wird das lösliche sAPP $\beta$  freigesetzt. Weitere Prozessierung des verbleibenden C-terminalen Fragments des APP (CTF $\beta$ ) durch die  $\gamma$ -Sekretase generiert das neurotoxische A $\beta$  und die verbleibende intrazelluläre Domäne (AICD). In der nicht-amyloidogenen Prozessierung des APP zur rechten Seite der Darstellung kommt es zunächst zu einer Spaltung des APP an der  $\alpha$ -Sekretase Schnittstelle des APP. Es entsteht das größere lösliche sAPP $\alpha$  und ein kleineres C-terminales Fragment (CTF $\alpha$ ).



Die  $\gamma$ -Sekretase spaltet nun das CTF $\alpha$  und es wird ein kleines extrazelluläres Fragment (p3) freigesetzt, welches kein neurotoxisches Potential aufweist. (Schmidt, 2016)

Nicht nur die Produktion des Amyloid  $\beta$  alleine führt zur Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung. Es handelt sich vielmehr um ein komplexes Zusammenspiel, in welchem es durch viele Faktoren letztendlich zu einer Störung der Homöostase des gesamten Zentralnervensystems kommt.

## 1.5 Die Rolle der Metalloprotease Meprin beta in der Alzheimer-Erkrankung

Das wohl am besten charakterisierte Substrat der Metalloprotease Meprin beta ist das APP. Wie auch das  $\beta$ -site APP-cleaving enzyme (BACE-1), prozessiert Meprin beta das APP an der  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle und führt so zur Generierung von A $\beta$ -Peptiden (Bien *et al.*, 2012; Schönherr *et al.*, 2016).

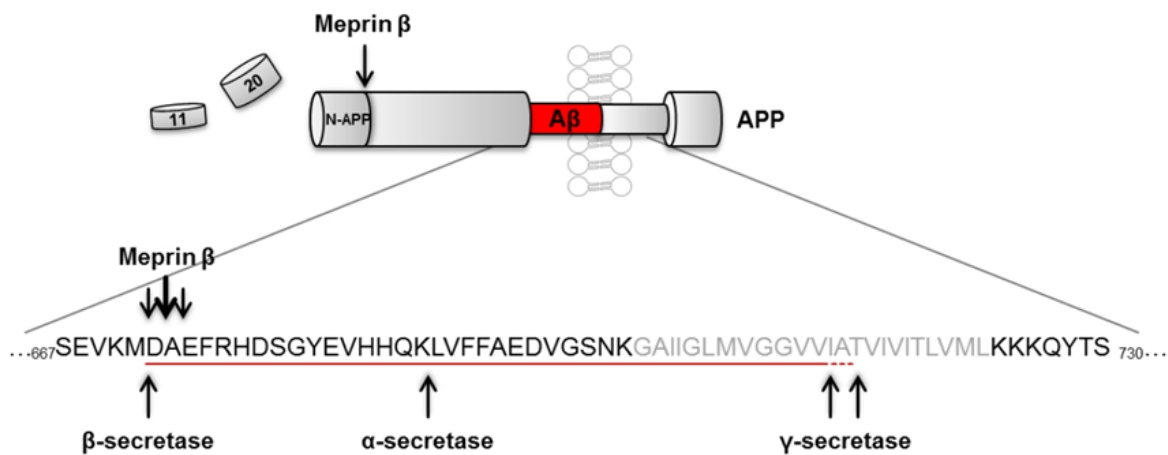


Abbildung 5:

**Prozessierung des APP durch Meprin beta.** Meprin  $\beta$  prozessiert APP an der  $\beta$ -Sekretase Spaltstelle. Nach Prozessierung durch die  $\gamma$ -Sekretase entstehen N-terminal gekürzte A $\beta$ -Peptide (im Bild durch die rote Linie verdeutlicht). Zusätzlich spaltet Meprin  $\beta$  nicht-toxische N-terminale Fragmente des APP mit einer Größe von 11 bzw. 20 kDa. (Schmidt, 2016)

Im Rahmen einer kürzlich durchgeführten proteomischen Studie konnte APP als Substrat für Meprin beta identifiziert werden (Jefferson *et al.*, 2011). In dieser Studie wurde ebenfalls herausgearbeitet, dass Meprin beta nicht-toxische N-terminale Fragmente (11 und 20 kDa, Abb. 5) des APP abspaltet, welche in Hirnlysaten von humanen Proben nachgewiesen werden konnten. Im Gegensatz zu BACE-1, welches das APP hauptsächlich an p1(A $\beta_{1-x}$ ) spaltet, ist Meprin beta in der Lage APP an p2 zu spalten, was zur Generierung N-terminal-gekürzter A $\beta$ -Peptide beginnend an

p2(A $\beta$ <sub>2-x</sub>) führt. Die N-terminal-gekürzten A $\beta$ -Peptide zeigten eine höhere Anfälligkeit zur Aggregation als die ungekürzten A $\beta$ -Peptide, welche durch Prozessierung durch BACE-1 entstehen (Schönherr *et al.*, 2016). Einen weiteren Hinweis auf eine konkrete Beziehung zwischen der Alzheimer Erkrankung und Meprin beta lieferte eine RNA Analyse. Hirnproben von Patienten, welche von der Alzheimer betroffen waren, zeigten höhere mRNA Level verglichen mit altersangepassten Kontrollproben (Bien *et al.*, 2012).

## 1.6 Die Rolle des TREM2 in der Alzheimer-Erkrankung

Die Bedeutung des TREM2 in neurodegenerativen Erkrankungen wurde während einer Studie zur Charakterisierung der Nasu-Hakola Erkrankung (NHD, auch bekannt als Polyzystische lipomembranöse Osteodysplasie mit sklerosierender Leukenzephalopathie) entdeckt. Eine Krankheit, die sich durch präsenile Demenz, häufige Knochenfrakturen und Knochenzysten auszeichnet (Paloneva *et al.*, 2001). Betroffene dieser Erkrankung tragen homozygote *Loss-of-function*-Mutationen in den Genen für TREM2 oder DAP12 (Paloneva *et al.* 2002; Klünemann *et al.* 2005). Die präsenile Demenz der Betroffenen ähnelt in den Symptomen einer Frontotemporalen Demenz (FTD). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass homozygote Träger von *Missense*-Mutationen des TREM2, wie p.T66M und p.Y38C, von Symptomen betroffen sind, welche denen einer FTD entsprechen (R. Guerreiro, Bilgic, *et al.*, 2013; R. J. Guerreiro *et al.*, 2013). Genomweite Assoziationsstudien (GWAS) identifizierten heterozygote *Missense*-Mutationen als Risikofaktoren für Morbus Alzheimer (AD), Morbus Parkinson (PD) und Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) (Jonsson *et al.*, 2013; R. Guerreiro, Wojtas, *et al.*, 2013; Rayaprolu *et al.*, 2013; Borroni *et al.*, 2014; Cady *et al.*, 2014; Cuyvers *et al.*, 2014). Vor allem für die *Missense*-Mutationen p.R47H und p.R62H liegt eine klare Verbindung zur frühzeitigen Entwicklung eines *Late Onset Alzheimer's Disease* (LOAD) vor (Jin *et al.*, 2014). Eine Veränderung der Bindungsstelle für Liganden des TREM2 scheint die Funktionalität des Rezeptors negativ zu kompromittieren (Abb. 6). Das Risiko zu erkranken steigt im selben Maß wie für Träger des Apo-E4 Allels und macht eine Verbindung zwischen neurodegenerativen Erkrankungen und der angeborenen Immunantwort deutlich (Golde, Streit and Chakrabarty, 2013). Weitere *Missense*-Mutationen können ebenfalls die Proteinfaltung so beeinflussen, dass ein vollständig dysfunktionaler Rezeptor exprimiert wird (Abb. 6).

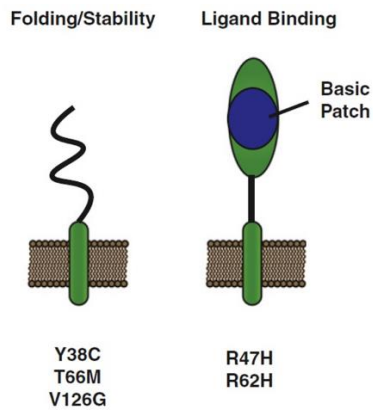


Abbildung 6:

**Punktmutationen in TREM2.** Varianten in der Ig-Domäne des TREM2 beeinflussen entweder die Proteinfaltung und Stabilität (Y38C, T66M, V126G) oder verändern die Bindungsstelle für Liganden, wie es für die Alzheimer-assoziierten Mutanten (R47H, R62H) der Fall ist. (Kober and Brett, 2017)

TREM2 wird eine zentrale Rolle in verschiedenen Hirnarealen zugeschrieben (Forabosco *et al.*, 2013). Im Zentralnervensystem wird TREM2 hauptsächlich von Mikroglia exprimiert, in welchen es für Differenzierungsprozesse und für den Erhalt der Homöostase verantwortlich ist (Mazaheri *et al.*, 2017; Ulland *et al.*, 2017). Unter anderem reguliert TREM2 hier essentielle Funktionen wie die Phagozytose und das Abräumen apoptotischer Neuronen (Takahashi, Rochford and Neumann, 2005; Klesney-Tait, Turnbull and Colonna, 2006; Hsieh *et al.*, 2009). TREM2<sup>-/-</sup> Mäuse zeigen eine geringere Anzahl an Mikroglia, welche ebenfalls eine höhere Rate an Apoptose aufweisen (Yuan *et al.*, 2016). Im Mausmodell einer T66M *Knock-in*-Mauslinie zeigte sich eine negative Beeinflussung der Hirnperfusion und des cerebralen Glukosemetabolismus (Kleinberger *et al.*, 2017).

Hauptgrund für die Entwicklung des Morbus Alzheimer sind Aggregate von A $\beta$ -Peptiden, welche auch als A $\beta$ -Plaques bezeichnet werden. Diese führen entweder direkt oder indirekt über Beeinflussung weiterer neurotoxischer Ereignisse, wie die Aggregation von tau-Fibrillen, zur Neurotoxizität und dem Untergang von Neuronen (Musiek and Holtzman, 2015). Es ist davon auszugehen, dass nicht nur die gesteigerte Produktion von A $\beta$ -Peptiden zur Ausprägung der Erkrankung führt, sondern ebenfalls eine gestörte Inflamationsreaktion. Diese kann durch Dysbalancen in der Freisetzung von Zytokinen einen toxischen Einfluss auf die Neuronen haben und führt ebenfalls zu einem verminderten Abbau der A $\beta$ -Plaques. 5xFAD Mäuse defizient für TREM2 (TREM2<sup>-/-</sup>) im Alter von 8 Monaten zeigten eine erhöhte Last an A $\beta$ -Aggregaten und eine verminderte Reaktion der Plaque-assoziierten Mikroglia (Wang *et al.*, 2015, 2016). Ein weiteres Modell mit APPPS1 Mäusen heterozygot für TREM2 gab ebenfalls Hinweise auf eine verminderte Reaktion der Mikroglia, welche zusätzlich deutlich kleiner und in verminderter Zellzahl auftraten (Ulrich *et al.*, 2014). Die Mikrogliose in TREM2 defizienten Tieren war somit deutlich schwächer ausgeprägt. Mäuse mit einer *in vivo* TREM2-Überexpression zeigten eine geringere Last von A $\beta$ -Aggregaten und eine verringerte generalisierte Entzündungsreaktion (Jiang *et al.*, 2014). Analog zur A $\beta$ -Pathologie konnte zudem ein positiver Einfluss des TREM2 auf tau-Pathologien hergeleitet

werden (Jiang *et al.*, 2015, 2016). Cuprizone-Mausmodelle, welche auf Grund der konsistenten Demyelinisierung zur Untersuchung der Multiplen Sklerose (MS) verwendet werden, mit einer zusätzlichen TREM2 Defizienz demonstrierten eine deutliche Steigerung des entstandenen Myelin Debris (Cantoni *et al.*, 2015). Die Proliferation der Mikroglia und ihr Gesamtüberleben waren auch hier deutlich reduziert (Poliani *et al.*, 2015). Die Mikroglia nehmen in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit eine Schlüsselrolle ein. Sie sind als cerebrale Repräsentanten des Mononukleären-Phagozytären Systems (MPS) für die Abräumung der A $\beta$ -Plaques und ebenfalls für die Modulation der Inflamationsreaktion verantwortlich. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass TREM2 auf Mikroglia nach Bindung phospholipidischer Liganden über den mTOR (mechanistic target of Rapamycin)-*Pathway* die Bildung von Autophagosomen inhibiert (Ulland *et al.*, 2017). Eine verminderte Regulation dieses Prozesses auf Grund verminderter TREM2 Expression auf der Zelloberfläche führt zu einer funktionellen Einschränkung oder sogar zum Untergang betroffener Mikroglia. Der Zusammenhang einer gesteigerten Autophagie mit der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen ist ebenfalls beschrieben (Kiriya and Nochi, 2015). Es bestehen zwar vermehrte Zusammenhänge zwischen der Modulation der Inflammation durch TREM2, sowie zu der Bedeutung der Neuroinflammation im Kontext zu neurodegenerativen Erkrankungen, eine Implementierung dieser Thematik in diese Arbeit würden diesen jedoch nicht gerecht werden. Insofern sei auf exzellente Reviews zu diesen Themengebieten verwiesen (Calsolaro and Edison, 2016; Ransohoff, 2016). Derzeit wird ebenfalls an einem Signalling des sTREM2 geforscht. Studien arbeiteten mit TREM2<sup>-/-</sup>, sowie mit wildtypischen Zellen und konnten demonstrieren, dass sTREM2 unabhängig vom membranständigen TREM2 agiert. So wurden einige TREM2-assoziierte Funktionen wie Gesamtüberleben, jedoch nicht Proliferationssteigerung, mit dem sTREM2 erreicht. Dies suggeriert diskrete Rollen für TREM2 als membranständigen Rezeptor wie auch als lösliches Signalmolekül (Bouchon *et al.*, 2001; Zhong, X.-F. Chen, *et al.*, 2017).

## 1.7 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Untersuchung ob der *triggering receptor expressed on myeloid cells Type 2* (TREM2) ein Substrat für die Metalloprotease Meprin beta darstellt. Für diese Fragestellung verwenden wir Western-Blot Analysen eines transient überexprimierenden Zellsystems. Um zu prüfen ob diese proteolytische Prozessierung auch einen Einfluss auf TREM2-vermittelte Zellfunktionen hat, verwenden wir einen Phagozytoseassay mit Fluoreszenzkonjugaten, welcher über *Fluorescence-activated cell scanning* (FACS) ausgewertet wird. Schließlich analysieren wir die proteolytische Prozessierung des TREM2 in *bone marrow derived macrophages* (BMDM) aus einem Meprin beta *knock-out* Mausmodell und gleichen die Ergebnisse mit denen wildtypischer BMDM ab.

Auf Grund der Korrelation beider Proteine zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung scheint es uns von hoher Bedeutung zu sein, das Zusammenspiel dieser beiden Proteine zu untersuchen. Es ist bekannt, dass Meprin Metalloproteasen ein ähnliches Substratspektrum wie Proteasen der ADAM-Familie aufweisen. Diese konnten kürzlich als *Sheddases* des TREM2 identifiziert werden. Eine gleichzeitige proteolytische Prozessierung des TREM2 durch Meprin beta würde die Rolle von Meprin beta in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung neu definieren. Meprin beta ist verantwortlich für die Produktion von A $\beta$ -Peptiden, welche verstärkt zur Aggregation neigen. Ebenfalls konnte eine hochregulierte Transkription von Meprin beta in Hirnlysaten von Alzheimer-Patienten nachgewiesen werden. TREM2 ist ein essentieller Rezeptor der Mikroglia, welcher neben dem Erhalt der Homöostase auch die Phagozytose der entstandenen A $\beta$ -Plaques reguliert. Mutationen im TREM2-Gen resultieren in einem gesteigerten Risiko zur Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung, wie auch vieler weiterer neurodegenerativer Erkrankungen.

Durch die proteolytische Prozessierung des TREM2 würde Meprin beta die Rolle eines zweiseitigen Schwertes in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung einnehmen. Meprin beta sorgt für die Produktion der zur Aggregation neigenden N-terminal gekürzten A $\beta$ -Peptide und nimmt dem Organismus gleichzeitig die Fähigkeit angemessen zu reagieren, indem durch proteolytische Prozessierung des TREM2 die Mikroglia ihrer Funktionen beraubt werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Laborgeräte

Die für diese Arbeit verwendeten Laborgeräte sind in Tabelle 1 alphabetisch aufgelistet. Für jedes Laborgerät ist die Gerätebezeichnung und der Hersteller mit Firmensitz angegeben.

Tabelle 1: **Laborgeräte**

<b>Laborgerät</b>	<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Autoklav	HST4-5-6	Zirbus, Bad Grund
Bakterieninkubator	/	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Bakterienschüttler	Multitron Standard	Infors HAT, Bottmingen/Basel
<i>Blotting</i> Geräte	Bio Rad Power Pac™ HC Bio Rad Power Pac™ Basic	Bio-Rad, Hercules
<i>Blot</i> Kammern	Criterion™ Blotter Mini Trans-Blot® cell	Bio-Rad, Hercules
Chemilumineszenzdetektions-System	Luminescent Image Analyzer LAS-3000 mini	Fujifilm, Düsseldorf
Dokumentenscanner	Canon Scan 8800F	Canon Deutschland GmbH, Krefeld
Durchflusszytometer	BD FACS Canto™ II	BD Biosciences, San Jose
Eismaschine	/	Manitowoc
Elektrophoreseapparatur (für	Bio-Rad Mini-Protean Tetra System	Bio-Rad, Hercules

<i>Sodium dodecyl sulfate</i> (SDS)-		
Elektrophorese	PowerPac 3000	Bio-Rad, Hercules

Elektrophorese Spannungsquelle	277BR-05151	Biometra, Göttingen
Feinwaage	572-35	KERN & SOHN GmbH, Balingen
Feinwaage	QUINTIX213-1S	Sartorius AG, Göttingen
Gefrierschrank (-20 °C)	Comfort	Liebherr, Bulle
Gefrierschrank (-80 °C)	Hera freeze	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Gelelektrophoresesystem (für Agarose-Gele)	/	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Homogenisator	Precellys® 24	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Inverses Mikroskop	Leica DMI8	Leica, Wetzlar
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	FV1000	Olympus, Tokio
Kryogefrierschank (-150 °C)	VIP Plus	Sanyo, Moriguchi
Kühlmodul	Kühlmodul für Precellys® 24 & 24-Dual	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Kühlschrank	Profiline	Liebherr, Bulle
Kühlzentrifuge	Heraeus Biofuge Primo R	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Kühlzentrifuge Zellkultur	Heraeus Multifuge 3S-R	Thermo Fisher Scientific, Waltham

Kühlzentrifugen (Tischzentrifugen)	Centrifuge 5415-R Centrifuge 5417-R Centrifuge 5427-R	Eppendorf, Hamburg
Lichtmikroskop	CKX 41	Olympus, Hamburg
Light Cycler®	Light Cycler® 480 II	Roche, Basel
Magnetrührer	RH Basic 2 IKAMAG RCT	IKA, Staufen
Mikroplattenleser	Infinite F200 Pro	Tecan Trading AG, Männedorf

Mikroplattenleser	Spark	Tecan Trading AG, Männedorf
Mikroplattenleser	BioTek Synergy HT	BioTek, Winooski
Mikrowelle	NN E232M	Panasonic, Wiesbaden
Minizentrifuge	Rotilabo®-mini- centrifuge	Roth, Karlsruhe
pH-Meter	S20-Seven Easy™ pH	Mettler Toledo, Gießen
Pipetten	Research plus (10 µl, 100 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Der accu-jet® pro Pipettierhelfer	Brand, Wertheim
Plattformschüttler	Vibramax100	Heidolph, Schwabach
Reinstwasseranlage	MilliQ Plus	Merck Millipore, Darmstadt
Rollermixer	Roller Mixer SRT1 Roller Mixer SRT9	Stuart, Stone
Spektrophotometer	NanoDrop-1000 (ND- 1000)	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Sterilbank	Herasafe™ KS12	Thermo Fisher Scientific, Waltham



Tiefkühlgefrierschrank -80 °C	Herafreeze	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Tischzentrifuge	Mikro 120 Centrifuge 5415-D	Hettich, Tuttlingen Eppendorf, Hamburg
Ultraschallbad	Branson Sonifier 450	Heinemann, Schwäbisch Gmünd
Ultrazentrifuge	Optima™ Max-XP	Beckman Coulter, Kalifornien
UV Transilluminator	Intas UV-Systeme	Intas Science Imaging Instrumens GmbH, Göttingen
Vortexer	Vortex Genie 2™  Heidolph Reax top	Scientific Industries, New York  Heidolph Instruments GmbH & CO. KG,
Wärmeblock	Thermostat plus	Eppendorf, Hamburg
Wärmemixer	ThermoMixer F1.5, comfort	Eppendorf, Hamburg
Wärmebad Zellkultur	Bead Beaths	Lab Armor, USA
Wasserbad	GFL	Erich Eydam KG, Kiel
Zellkulturinkubator	Heracell™ 150	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Zellzählsystem	Nucleo Counter NC- 200	Nexelom, Lawrence

### 2.1.2 Labor-/Verbrauchsmaterialien

In Tabelle 2 werden die verwendeten Labor- und Verbrauchsmaterialien alphabetisch aufgelistet. Es wird die Materialbezeichnung, sowie der Hersteller und der Bezugsort genannt.

Tabelle 2: **Labor-/Verbrauchsmaterialien**

<b>Materialbezeichnung</b>	<b>Hersteller, Bezugsort</b>
Autoklavierband	Carl Roth, Karlsruhe
Bechergläser	Simax, Selb
Bunsenbrenner Campingaz™ Labogaz 206 r	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Centrifugal Filters Amicon® Ultra-15	Merck Millipore, Darmstadt
Cryo-Pure Gefäß 1,8 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Dako Pen	Agilent, Santa Clara
Deckgläser Ø 12 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Deckgläser 24 x 60 mm	Carl Roth, Karlsruhe
Einmalspritzen 5 ml	Braun, Melsungen
Erlenmeyerkolben	Fischerbrand, Schwerte
Etikettendrucker Brady BMP21	Brady, Milwaukee
FACS-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Gelständer	Bio Rad, Hercules
Glasflaschen	Duran, Wertheim/Main

Glasplatten für SDS-Gele Mini Protean® Short Plates und Glass Plates 1,5 mm	Bio Rad, Hercules
Hamilton® Pipettenspitze	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Handschuhe Nitril blau	Carl Roth, Karlsruhe
Handschuhe Nitril weiß	Kirchhoff, Hamburg
Impfeschlingen	Sarstedt, Nümbrecht
Kanüle, Sterican 27G Gr.20	Braun, Melsungen
Kulturschalen (100x 20 mm)	Sarstedt, Nümbrecht
Magnetrührer	Carl Roth, Karlsruhe
Messzylinder (Glas)	Brand, Wertheim
Messzylinder (Plastik)	Vitlab, Großostheim

Mikro-Schraubröhre 2 ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht
Mikrotiterplatte (96-Loch)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Multiwell-Platte 384 für Light Cycler® 480	Roche, Mannheim
NucleoCounter®, Via1-Cassette™	ChemoMetec, Allerød
Objekträger (76 x 26 mm)	Carl Roth, Karlsruhe
Parafilm® M	Erich Eydam KG, Kiel
Pasteurpipetten	Carl Roth, Karlsruhe
Pinzette	Fine Science Tool, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen MultiFlex®-tips	Carl Roth, Karlsruhe
Pipettenspitzen (gestopft) Biosphere® Filter Tip 2,5 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Puresept Desinfektion	Merz, Frankfurt am Main
Immobilon-P Membran (PVDF Transfer Membran IPHV00010, Porengröße 0,45 µm)	Merck Milipore, Darmstadt
Reagiergefäß	Sarstedt, Nümbrecht
Röhren (15/ 50 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Sicherheitsbehälter	Carl Roth, Karlsruhe
Skalpell	Bayha, Tuttlingen
TC-Inserts, 12 well PET 0,4 µm TL	Sarstedt, Nümbrecht
TC-Platte Standard F, 6, 12 und 96 Loch	Sarstedt, Nümbrecht
Tücherbox	Carl Roth, Karlsruhe
Universal Probe Library Set	Sigma-Aldrich, St. Louis
Vernichtungsbeutel	Sarstedt, Nümbrecht
Versiegelungsfolie Light Cycler® 480	Roche, Mannheim
Western Blot Gelgießsystem	Bio-Rad, Hercules
Western Blot Laufkammer	Bio-Rad, Hercules

Whatman-Papiere	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber 25 cm	Sarstedt, Nümbrecht

### 2.1.3 Chemikalien

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von der Carl Roth AG bezogen oder werden explizit genannt. Reinstwasser wurde mit dem *Milli-Q® Integral water purification system* produziert und trägt im weiteren Text die Abkürzung ddH<sub>2</sub>O.

### 2.1.4 Puffer

Alle für diese Arbeit verwendeten Puffer sind in der Tabelle 3 aufgelistet.

Tabelle 3: **Zusammensetzung der verwendeten Puffer.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierungspuffer	3% (w/v) BSA oder 5% (w/v) Magermilchpulver, TBS
FACS/MACS Puffer	PBS pH 7.4, 0.5% (w/v) BSA (Albumin Fraktion V), 2mM EDTA
Fixierlösung	4% (w/v) PFA, PBS
HEPES	20 mM HEPES, pH 7.5
Lysispuffer	PBS pH 7.4, 1% (v/v) Triton X-100, Complete Protease inhibitor cocktail Tablette (Roche)
Live Cell Imaging Solution (ThermoFisher Scientific)	20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 KCl, 1.8 CaCl <sub>2</sub> , 1 mM MgCl <sub>2</sub> , ph 7.4, mOsm=300
Membranfraktionierungspuffer	1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 0,1 mM TRIS, pH 7

PBS	135 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 9.2 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 1.8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7.4
Probenpuffer (5x)	2.5 ml Tris-HCl pH 6.8, 1 g SDS, 2.5 ml ddH <sub>2</sub> O, 0.05 g Bromophenol blue, 5 ml Glycerol, 100-200 mM DTT
Puffer Sammelgel	0.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS, pH 6.8
Puffer Trenngel	1.5 M Tris, 0.4% (w/v) SDS, pH 8.8
SDS-PAGE Laufpuffer	0,1% (w/v) SDS, 1.92 M Glycin, 0.25 M Tris, pH 8.3
Semidry Anodenpuffer	300 mM Tris, pH 10.4
Semidry Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM Glycin, 20 % (v/v) Methanol, pH 8.0
Tank Blot Puffer	25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, pH 8.3
TBS	20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7.5
TBS-T	20 mM Tris, 100 mM NaCl, 0.05% (v/v) Tween 20, 0.2% (v/v) Triton X-100, pH 7.5

### 2.1.5 Zellkultur

In Tabelle 4 werden alle extern bezogenen Nähr-/Kulturmedien, sowie Medien zur weiteren Prozessierung und Transferierung, der durchgeführten Zellversuche genannt. Selbst hergestellte Standardsupplemente finden sich in den aufgelisteten Puffern (Tabelle 3). Genannt werden die Materialbezeichnung, der Hersteller und der Bezugsort.

Tabelle 4: **Verwendete Materialien für die Zellkultivierung**

Materialbezeichnung	Hersteller, Bezugsort
Accutase StemPro <sup>®</sup>	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad
Aqua Care CF, Wasserbadschutz	Akadia-Chemie, Mannheim
Concanavalin A Beads	Sigma-Aldrich, St. Louis
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad
Fetales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> , FCS)	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad
M-CSF ( <i>Macrophage colony stimulating factor</i> )	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Penicillin-Streptomycin	Gibco <sup>®</sup> Life Technologies, Carlsbad

0.5 % Trypsin Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (10x)	Gibco® Life Technologies, Carlsbad
---	------------------------------------

### 2.1.6 Mäusstämme

In Tabelle 5 werden die verwendeten Mäusstämme für die *ex-vivo* Versuche genannt.

Tabelle 5: **Mäusstämme**

Genotyp	Linie	Referenz
<i>WT</i>	C57BL/6J	(Murray <i>et al.</i> , 1935)
<i>Mep1b</i> <sup>-/-</sup>	C57BL/6J	(Norman <i>et al.</i> , 2003)

### 2.1.7 Zelllinien

In Tabelle 6 werden alle, für diese Arbeit verwendeten, Zelllinien aufgelistet. Es wird die Bezeichnung der jeweiligen Zelllinie und deren Charakteristik/Ursprung genannt. Ebenfalls werden Quellenangaben und Referenzen genannt.

Tabelle 6: **Zelllinien**

Zelllinie	Charakteristik
BMDM	Primäre, aus dem Knochenmark isolierte, murine Makrophagen
HEK 293T	Humane embryonale Nierenzellen (Pear <i>et al.</i> , 1993), bezogen von der DSMZ Braunschweig
HEK 293T (ADAM10/17 <sup>-/-</sup> )	Humane embryonale Nierenzellen (Franke <i>et al.</i> , 2016), Biochemisches Institut der CAU Kiel
THP-1	Humane monozytäre Vorläuferzelllinie (Tsuchiya <i>et al.</i> , 1980), bezogen von der DSMZ Braunschweig

### 2.1.8 Plasmide

Die verwendeten Plasmidkonstrukte für TREM2, sowie für das TREM2/DAP12 Fusionskonstrukt (Schlepckow *et al.*, 2017), wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Dr.

Christian Haass (DZNE München) überlassen. Alle weiteren Plasmide stammen aus der Sammlung des Biochemischen Instituts der CAU Kiel und werden in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: **Plasmide**

Gen	Herkunft	N-Tags	C-Tags	Vektor	Resistenz
ADAM10	Human	-	-	pcDNA3.1	amp
ADAM10	Human	FLAG3	-	pcDNA3.1	amp
ADAM17	Human	-	-	pCMV3	amp/hygro
Leervektor				pcDNA3.1	amp
Meprin beta	Human	-	-	psG5	amp
Meprin beta E153A	Human	-	-	psG5	amp
TREM2	Human	HA	FLAG	pcDNA3.1	amp
TREM2/DAP12	Human	HA	-	pcDNA5/FRT	amp

### 2.1.9 Antikörper

In Tabelle 8 werden alle verwendeten Primärantikörper für das Western Blot Verfahren aufgelistet. Es wird das Zielantigen, der Hersteller, die entstammende Spezies und die verwendete Konzentration genannt. Alle Sekundärantikörper stammten von *Jackson ImmunoResearch*. Verwendete Sekundärantikörper waren *Horseradish-peroxidase* (HRP)-gekoppelt und wurden in einer Konzentration von 1:10.000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS verwendet.

Tabelle 8: **Primärantikörper**

Antigen	Hersteller	Spezies	Verwendung
Actin (human), A2206	Sigma	Rabbit	1:2500
ADAM10, ab124695	Abcam	Rabbit	1:1000
FLAG-tag, F1804	Sigma	Mouse	1:2500
GAPDH (human), 14C10	Cell Sign.	Rabbit	1:1000
HA-tag, H3663	Sigma	Mouse	1:1000

Meprin beta (human), Tier2	Pineda	Rabbit	1:1000
Meprin beta (murin), A3300	R&D	Goat	1:1000
Transferrinrezeptor, ab84036	Abcam	Rabbit	1:1000
TREM2 (human), AF1828	Abcam	Goat	1:1000
TREM2 (murin), clone 5F4	(DZNE)	Rat	1:100
TREM2 (murin), clone 14D1	(DZNE)	Rat	1:25
TREM2 (murin), AF1729	R&D	Mouse	1:1000
STAT3 (human), AF17991	R&D	Mouse	1:1000

Tabelle 9 führt die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper für die Immunfluoreszenz auf.

Tabelle 9: **Antikörper Immunfluoreszenz**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Spezies</b>	<b>Verwendung</b>
HA-tag, H3663	Sigma	Mouse	1:1000, 1h RT
Meprin beta (human), Tier2	Pineda	Rabbit	1:1000, 1h RT
<b>Sekundärantikörper</b>			
AF 594, anti-Mouse IgG	(A11032) ThermoFisher Scientific	Goat	1:300, 1h RT
AF 488, anti-Rabbit IgG	(A21206) ThermoFisher Scientific	Donkey	1:300, 1h RT



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur und Transfektion

Alle Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in einem dafür qualifizierten S1 Labor gehalten. Eingesetzte Geräte waren für den Gebrauch in der Zellkultivierung geeignet. Verwendete Zelllinien sind in Tabelle 2 angegeben. Alle Zelllinien wurden in *Dulbeccos Modified Eagle Medium* (DMEM) kultiviert, welches als Supplemente 10% hitzeinaktiviertes fetales Kälberserum (FCS, Gibco) und 1% Penicillin/Streptomycin enthält. Zur Differenzierung und Kultivierung der *bone marrow derived macrophages* (BMDM) wurden 0,05 µg *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) je ml Medium substituiert. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einem befeuchteten Inkubator gehalten und alle 2-3 Tage passagiert.

Bei einer Wachstumsdichte von 70-80% erfolgte die Transfektion der Zellen. Zur transienten Transfektion wurden 6 µg Plasmid-DNA und Polyethylenimin (PEI) im Verhältnis 1:3 (PEI 1mg/ml in ddH<sub>2</sub>O, Polysciences) als Transfektionsreagenz verwendet. Nur für THP-1-Zellen wurde als Transfektionsreagenz X-treme Gene HP (Merck) im Verhältnis 2:1 zur Plasmid-DNA verwendet. 16-20 Stunden nach transienter Transfektion erfolgte die Umstellung auf serumfreies Medium. Für Versuche mit rekombinanten Proteasen wurden diese in das serumfreie Medium hinzugegeben mit jeweiligem Ende der Inkubationszeit zum Zeitpunkt der Zellernte. Überstände, welche Proteine aus Sekretion oder Shedding enthielten, wurden bei 130 x (g) für 5 min zentrifugiert um sie von freien Zellen und Zelldebris zu säubern und unmittelbar danach bei -20°C gelagert.

### 2.2.2 Zellyse

Adhärente Zellen wurden nach Abnahme der Überstände mit einem Zellschaber (25 cm, Sarstedt) geerntet und 3x mit sterilem PBS gewaschen. Es folgte die Lyse der Zellen in Lysispuffer für 60 min bei 4°C. Während dieser Zeit wurden die Proben mehrfach stark gevortext und nach 30 min für 10 s mit Ultraschall behandelt. Nach Zentrifugation bei 13.000 x (g) für 30 min wurde der verbliebene Überstand abgehoben und die totale Proteinkonzentration mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kit* (ThermoFischer Scientific) nach Angaben des Herstellers ermittelt. Im Anschluss wurden die Proben mit 5x Probenpuffer versetzt und bei 95°C für 10 min denaturiert.

### 2.2.3 Zellyse für die Membranfraktionierung

Für die Membranfraktionierung wurden adhärente Zellen ebenfalls mit einem Zellschaber geerntet und anschließend 3x in eiskaltem sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Membranfraktionierungspuffer resuspendiert, welcher frisch mit Proteaseinhibitor versetzt wurde und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein *Snap Freezing* in flüssigem Stickstoff und unmittelbar nach dem Auftauen wurden die Zellen, welche nun die Integrität ihrer Membran verloren hatten, für 30 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und das Pellet in Lysispuffer resuspendiert. Nach 20 min Inkubationszeit wurde erneut bei 13.000 rpm für 45 min zentrifugiert. Überstände wurden abgehoben und nach Proteinkonzentrationsbestimmung wurden die Proben in 5x Probenpuffer bei 95°C für 10 min denaturiert.

### 2.2.4 Fällung der Überstände mit Concanavalin A

Nach Abnahme der Überstände wurden diese bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert um sie von freien Zellen und Zelldebris zu säubern. Concanavalin A Beads (C9017, Sigma) wurden 3x in sterilem PBS gewaschen. Auf 1 ml Probe wurden 50 µl der Beads hinzugegeben. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C auf einem Rotationsrad inkubiert. Zur weiteren Verwertung wurden die Beads herunterzentrifugiert und 3x in sterilem PBS gewaschen. Nach Hinzugabe von 40 µl 5x Probenpuffer und 20 µl ddH<sub>2</sub>O erfolgte die Lösung und Denaturierung der Proteine bei 95°C für 10 min. Zur Verwertung der Proben für das Western Blot Verfahren wurden die Überstände an die Proteinkonzentrationen der Lysate angepasst.

### 2.2.5 SDS-PAGE und Western Blotting

Für die Separierung der Proteine aus Lysaten und Überständen wurde die SDS-PAGE unter reduzierenden Bedingungen genutzt. Hierzu wurden 8-16% Acrylamid-Gele verwendet. Die Separierung erfolgte bei 110 V für 60-120 min. Die Proteine wurden mit dem *Tank-Blot*-Verfahren (400 mA, 120 min) auf eine Nitrocellulose-Membran (0,2 µm Amershan Protran, GE Life Sciences) übertragen. Vor Zugabe des Primärantikörpers wurden die Membranen für 90 min bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Primärantikörper wurden abgenommen und vor der Zugabe des Sekundärantikörpers wurden die Membranen 3x für 15 min in TBS geschwenkt. Im Anschluss wurden die Membranen für 60 min bei Raumtemperatur mit Sekundärantikörper behandelt. Alle Sekundärantikörper stammten von *Jackson ImmunoResearch*. Verwendete Sekundärantikörper waren *Horseradish-peroxidase* (HRP)-gekoppelt und wurden in einer Konzentration von 1:10.000 in 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS

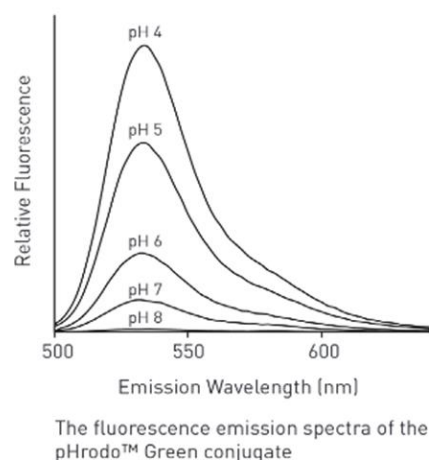
verwendet. Überschüssige Sekundärantikörper wurden durch Wiederholung des Waschvorgangs mit TBS entfernt. Zur Darstellung der Signale wurden das *Super Signal West Femto Kit* (ThermoFisher Scientific) und der *LAS-3000 mini* (Fujifilm) verwendet.

## 2.2.6 Phagozytoseassay

Um die Phagozytosekapazität von HEK293T, THP-I Zellen und Primären murinen Makrophagen darzustellen, nutzten wir abgetötete *E.coli* Bakterien, welche mit einem Fluorogen gekoppelt sind (*pHrodo green E.coli*, ThermoFisher Scientific). Dieses Fluorogen weist erst eine Fluoreszenz auf, nachdem es einem sauren Milieu ausgesetzt wird (Abb. 7). Im Unterschied zu lumineszierenden Stoffen ist so eine hoch sensitive Messung der Phagozytose möglich, da erst im späten Phagolysosom der pH ausreichend gering ist. HEK 293 ADAM10/17 <sup>-/-</sup> und PMA-induzierte Makrophagen aus THP-I Zellen wurden dem Versuchsaufbau entsprechend transfiziert und 24 h vor Versuchsbeginn auf einer 96-Well-Platte ausgesät, in einer Dichte von  $8 \times 10^4$  Zellen/Well. Nach Abnahme des Mediums wurden die Zellen 2x mit *Live Cell Imaging Solution* (ThermoFisher Scientific) gewaschen. Negativkontrollen wurden 30 min vor Zugabe der Fluoreszenzkonjugate mit 10  $\mu$ M Cytochalasin D (Life Technologies) behandelt. Es folgte die Zugabe von 50  $\mu$ l der Fluoreszenzkonjugate in einer Konzentration von 1  $\mu$ g/ $\mu$ l in *Live Cell Imaging Solution*. Nach 120 min Inkubation wurde die Suspension vorsichtig abgesaugt und die Wells 2x mit MACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in MACS-Puffer resuspendiert und anschließend in der Durchflusszytometrie analysiert.

Abbildung 7:

**Fluoreszenzspektrum *pHrodo green E.coli*.** *pHrodo* gekoppelte Bakterien weisen in saurem Milieu eine Fluoreszenz auf. Das Emissionsspektrum der Fluoreszenz von *pHrodo green* wird hier dargestellt. So konnte eine quantitative Analyse der Phagozytose mittels FACS beurteilt werden.



### 2.2.7 Durchflusszytometrie (FACS, Fluorescence-activated cell scanning)

Für die Durchflusszytometrischen Analysen des Phagozytoseassays (2.2.6) benutzten wir das FACSCanto (BD Biosciences). Die Daten wurden analysiert unter Verwendung der *FACSDiva* (BD Biosciences) oder *FlowJo Software* (Tree Star Inc.) ausgewertet.

### 2.2.8 Immunfluoreszenz

Zur Immunfluoreszenz wurden HEK293 ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen verwendet. Die Zellen wurden auf je 3 Coverslips (13 mm, Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG) pro Well in einer 6-Well-Platte ausgesät und bei einer Konfluenz von 50% transfiziert (2.2.1). Nach 24 h wurde auf serumfreies Medium umgestellt und nach weiteren 24 h mit der Fixierung begonnen. Zum Waschen der Coverslips wurden diese mit einer feinen Pinzette 3x in steriles PBS getaucht. Die weitere Verarbeitung fand ebenfalls zu je 3 Coverslips in einer 6-Well-Platte bei RT statt. Nun wurde für 10 min Fixierlösung auf die Coverslips gegeben und danach wurden diese erneut 3x in PBS getaucht. Für die Permeabilisierung der Zellen wurde je 1 ml entsprechender Lösung (0,12%(w/v) Glycin in PBS) in ein Well gegeben und für 10 min inkubiert. Es folgte ein Waschgang mit PBS worauf die Blockierung für 1 h bei RT folgte (10% (v/v) FCS, 0,2% (w/v) Saponin in PBS). Die Primärantikörper (Tab.4) wurden in sterilem PBS mit 10% (v/v) FCS eingesetzt. 60 µl dieser Lösung wurden auf einen Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, Menasha, WI) gegeben um dann den Coverslip mit den Zellen in Richtung der Antikörperlösung auf den Parafilm zu legen. Nach 60 min Inkubation wurden die Coverslips der Reihe nach in 5 Bechergläser mit 0,2% (w/v) Saponin in PBS getaucht um sie von überschüssigem Primärantikörper zu befreien. Nun wurden die Coverslips in einer feuchten und lichtundurchlässigen Kammer für 60 min bei RT mit Sekundärantikörper inkubiert. (Tab.5) Schließlich wurden die Coverslips wieder gewaschen wie beschrieben und zusätzlich 2x in ddH<sub>2</sub>O getaucht und anschließend mit 15 µl Mowiol/Dabco (17% (w/v) Mowiol, 33% (v/v) Glycerol, 50 mg/ml DABCO) und DAPI (1 µg/ml) auf Objektträger gezogen. Die optische Auswertung der Proben erfolgte mit einem konfokalen *Laser-Scanning-Mikroskop* (FV 1000; Olympus).

### 2.2.9 Ex-vivo-Versuche

Alle für diese Arbeit verwendeten Mäuse wurden in *individually ventilated cages* (IVC) bei einer Temperatur von 19-22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten. Dabei wurde ein möglichst natürlicher Tagesrhythmus von 12 h Licht und 12 h Dunkelheit eingehalten. Eine Versorgung mit Wasser und Trockenfutter erfolgte *ad libitum*. Der Umgang mit den Mäusen

erfolgte gemäß den Leitlinien der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel. Die Durchführung der Tierexperimente wurde vom Ministerium für Energiewende, Landwirtschaft, Umwelt und ländliche Räume Schleswig-Holstein genehmigt. (AZ: V242-230740/2015 (12-1/16))

### 2.2.10 Präparation primärer muriner Makrophagen

Murine Makrophagen aus Meprin beta *knock-out* und Meprin beta Wildtyp Mauslinien wurden auf Proteinexpressionslevel des mTREM2 untersucht. Die Versuchstiere wurden mit CO<sub>2</sub> narkotisiert und anschließend über einen Bruch ihres Genicks getötet. Hiernach wurden die Mäuse an ihren Extremitäten auf einer Präparationsplatte fixiert. Über einen Peritonealschnitt wurden die gewünschten inneren Organe entnommen. Um Zugang zu den *bone marrow derived macrophages* (BMDM) zu bekommen wurden den Tieren die hinteren Extremitäten abgetrennt und in steriles PBS überführt. Die weitere Präparation erfolgte nun endotoxinfrei unter der Zellkultur. Muskeln und Haut wurden vorsichtig entfernt um Femur und Crus zu isolieren. Nach der Abtrennung der Epiphysen wurden die Knochenschäfte mit einer Kanüle (0.4 x 20 mm, Sterican, Braun) und DMEM mehrfach durchspült. Das so bereits in Medium gewonnene Knochenmark wurde über ein Zellsieb (Falcon, A Corning Brand, 100µm) in 50 ml Falcons überführt. Mit Hilfe eines Hämocytometers (C-Chip, Nanoentek, Neubauer improved, dhc-N01) wurden die Zellen gezählt und in unbeschichtete 10 cm Zellschalen (TC-Schale 100, Cell+, Sarstedt) überführt in einer Dichte von 10<sup>7</sup> Zellen/Schale in 10ml DMEM (10% (v/v) FCS). Je 10 ml DMEM wurden 0,5 µg *macrophage colony stimulating factor* (M-CSF) substituiert. Die Zellschalen wurden 5 Tage bei 37°C inkubiert, wobei am dritten Tag weitere 5 ml Medium und 250 ng M-CSF hinzugegeben wurden. Die adhärenz gewachsenen Makrophagen konnten nun über das Absaugen des Überstandes isoliert werden. Die Makrophagen wurden 3x mit sterilem PBS gewaschen und für die Analysen im Western Blot Verfahren wie beschrieben weiterverarbeitet.

### 2.2.11 Statistische Analyseverfahren

Alle statistischen Analyseverfahren wurden mit der Software *GraphPad Prism 6.01* (GraphPad, La Jolla) durchgeführt. Für Mehrfachvergleiche führten wir zunächst einen *One-Way* ANOVA-Test durch, gefolgt von einem für mehrere Vergleichsgruppen geeigneten *Newman-Keuls*-Test. War die statistische Fragestellung lediglich auf eine Vergleichs- und eine Kontrollgruppe bezogen, wurde ein *Unpaired-t*-Test mit Berechnung eines *two-tailed* p-Werts zur Analyse herangezogen. Die Werte werden als *mean* +/- Standardabweichung dargestellt.

### 3 Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde untersucht ob der Oberflächenrezeptor TREM2, in membrangebundener wie auch in löslicher Form, ein Substrat für die Metalloprotease Meprin beta darstellt. Hierfür wurden proteinbiochemische Methoden genutzt. Ebenfalls wurde der Einfluss von Meprin beta auf TREM2 *ex vivo* im Mausmodell untersucht. Hierfür wurden Proben von Meprin beta *knock-out* Tieren mit Proben von Kontrolltieren verglichen.

#### 3.1 TREM2 ist ein Substrat der Metalloprotease Meprin beta

##### 3.1.1 TREM2 liegt als glykosyliertes Protein vor

HEK293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen wurden transient mit TREM2 transfiziert und die isolierten Proteine im Anschluss deglykosyliert. Die Bandenverschiebung in Abb. 8 macht deutlich, dass TREM2 als stark glykosyliertes Protein exprimiert wird. Die Entfernung der N-glykosidischen Verknüpfungen durch PNGase-F führte zu einer Reduktion der Masse um nahezu 10 kDa.

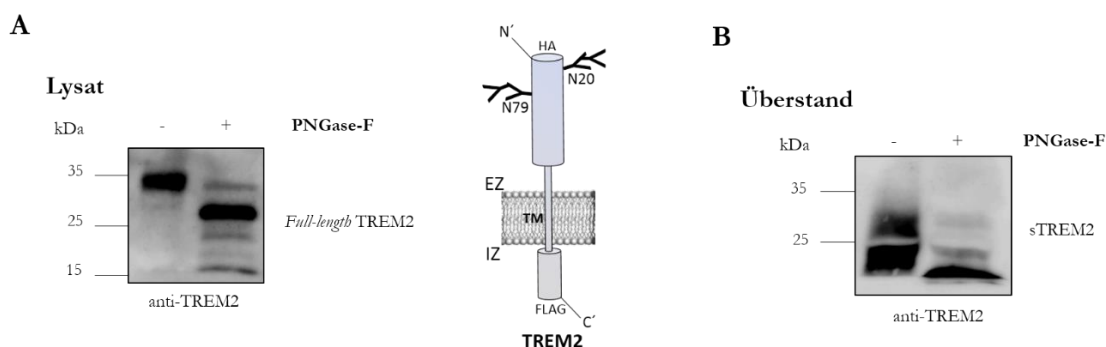


Abbildung 8:

**Deglykosylierung und Darstellung von TREM2 im Western Blot. (A)** Hek293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen. Proteine wurden isoliert und mit PNGase-F behandelt. Das *Full-length*-TREM2 ist im WB bei 35 kDa zu detektieren (AK: AF1628, R&D). Nach Entfernung der N-glykosidischen Reste (N20, N79) mit PNGaseF verbleibt eine prominente Bande bei 28 kDa. **(B)** Überstände wurden mit Concanavalin-A gefällt und das lösliche TREM2 (sTREM2) im WB dargestellt (AK: AF1828, R&D). Nach Inkubation mit PNGase-F vereinigen sich die Banden bei etwa 20 kDa.

### 3.1.2 Meprin beta spaltet TREM2 an der Zellmembran

Zur Beurteilung der Interaktion zwischen Meprin beta und TREM2 nutzten wir Hek293T Zellen, welche defizient für die Proteasen ADAM10 und ADAM17 waren (Franke *et al.*, 2016). Diese Proteasen konnten bereits als endogene Sheddasen des TREM2 identifiziert werden (Kleinberger *et al.*, 2014). ADAM10 und ADAM17 sind ebenfalls in der Lage Meprin beta von der Zelloberfläche zu spalten (Jefferson *et al.*, 2013; Herzog *et al.*, 2014). Der *Knockout* von ADAM 10 und ADAM 17 ermöglichte es den Effekt von Meprin beta und weiteren Proteasen auf TREM2 isoliert zu beobachten. In diesem Zellsystem wurde TREM2 zusammen mit Meprin beta, wie auch mit retransfiziertem ADAM 10 transient überexprimiert. Nach proteolytischer Prozessierung von TREM2 durch Shedding der Ektodomäne bildet das verbleibende C-terminale Fragment ein Substrat für die  $\gamma$ -Sekretase (Wunderlich *et al.*, 2013) (s. Abb. 9 A). Zur Anreicherung der C-terminalen Fragmente (CTFs) wurde jeder zweite Ansatz mit dem  $\gamma$ -Sekretase -Inhibitor DAPT (N-(N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl)-S-phenylglycine t-butyl ester) behandelt. Neben den Zellüberständen dienten so die C-terminalen Fragmente im Zelllysats als Hinweis auf die Menge des prozessierten TREM2. In Ko-Transfektionen von TREM2 und Meprin beta konnte ein Anstieg der C-terminalen Fragmente im Vergleich zur Kontrolle beobachtet werden (s. Abb. 9 B). In Zellüberständen aus Ko-Transfektionen von TREM 2 und Meprin beta zeigten sich jedoch geringere Mengen an sTREM2 im Vergleich zur Kontrolle, was auf eine weitere Degradierung des TREM2 durch Meprin beta hindeutete.

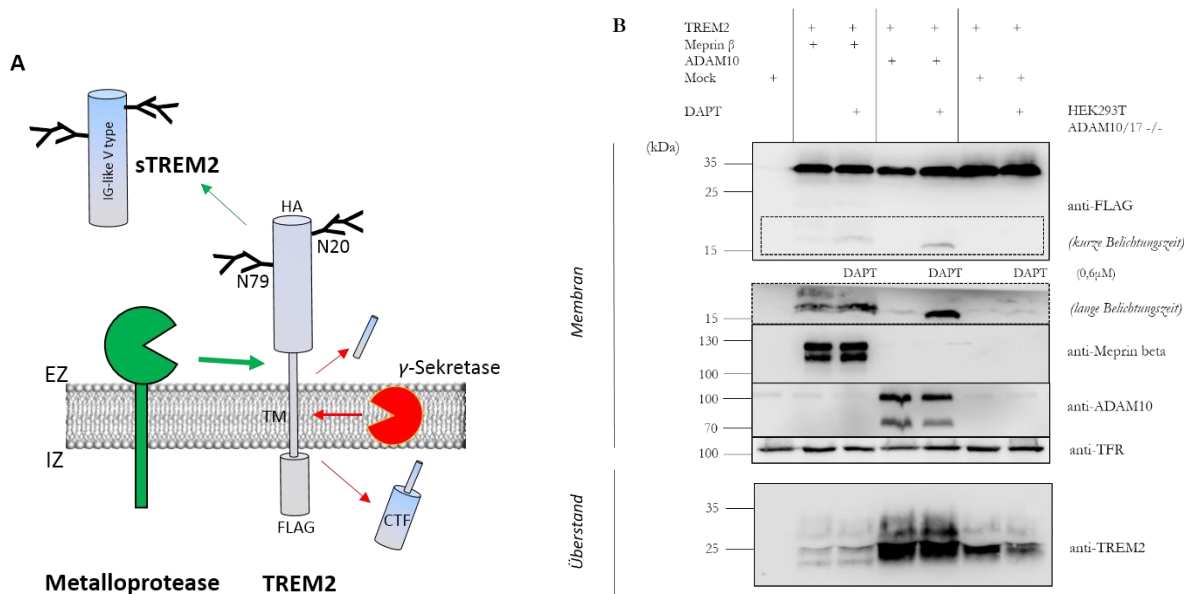


Abbildung 9:

**Ko-Transfektionen in HEK293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen.** (A) Schematische Darstellung. N20 und N79 markieren die N-glykosidischen Verknüpfungen. Das verwendete Konstrukt verfügt über einen N-terminalen HA-Tag und einen C-terminalen FLAG-Tag. (B) Ko-Transfektionen von TREM2 mit Meprin beta, wie auch mit retransfiziertem ADAM10. Als Ladekontrolle diente der Transferrinrezeptor (TFR). Das *Full-length*-TREM2 ist über den C-terminalen FLAG-AK detektiert und findet sich bei 35 kDa. C-terminale Fragmente (CTFs) sind bereits bei kurzer Belichtungszeit in DAPT-behandelten Ansätzen zwischen 15 und 20 kDa sichtbar. Im Überstand findet sich das sTREM2, welches durch Shedding der Ektodomäne des TREM2 entsteht. Auch in der Einzeltransfektion zeigt sich ein deutliches Signal für sTREM2. Bei einer Ko-Transfektion mit ADAM10 kommt es zu einem deutlichen Anstieg des sTREM2. In Ko-Transfektion mit Meprin beta zeigen sich geringere Mengen an sTREM2 als in der Einzeltransfektion. Nach langer Belichtungszeit bilden sich prominente Signale für die C-terminalen Fragmente. Durch Inhibition der γ-Sekretase zeigt sich vor allem nach Prozessierung durch ADAM10 ein deutlicher Anstieg der CTFs. Verbleibende CTFs in Ko-Transfektionen mit Meprin beta und ADAM10 zeigen distinkte Bandenmuster. Auch in der Einzeltransfektion werden CTFs deutlich. Repräsentative Darstellung von jeweils zwei nebeneinandergestellten biologischen Replikaten aus mindestens 6 unabhängigen Experimenten.

Eine Reduktion des *Full-length* TREM2 im Vergleich zur Kontrolle ist in Ko-Transfektion mit Meprin beta wie auch mit ADAM10 sichtbar (Abb. 9 B). Die Banden der verbleibenden CTFs in Ko-Transfektion mit Meprin beta haben ein distinktes Bandenmuster im Vergleich zu den CTFs, welche nach Prozessierung durch ADAM10 entstehen. Für Meprin beta scheinen mehrere mögliche Spaltstellen vorzuliegen. Verbleibende CTFs nach Ko-Transfektion mit Meprin beta zeigen keinen wesentlichen Anstieg nach Substitution von DAPT. Betrachtet man Überstände von ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen, welche nur mit TREM2 transfiziert wurden, so findet sich auch hier ein



deutliches Signal für das sTREM2. Somit scheinen neben Meprin beta und Proteasen der ADAM-Familie auch weitere Proteasen am Shedding der TREM2-Ektodomäne beteiligt zu sein. Überstände der Ko-Transfektion mit Meprin beta zeigen geringere Mengen an sTREM2 und es lassen sich keine weiteren Spaltfragmente in höherprozentigen Gelen detektieren.

### 3.1.3 Die rekombinante Ektodomäne des Meprin beta spaltet membrangebundenes TREM2 und sTREM2

Um eine weitere Degradierung des TREM2 durch Meprin beta nachzuweisen, inkubierten wir zunächst Überstände mit hohen Mengen an sTREM2 mit der rekombinanten Ektodomäne von Meprin beta.

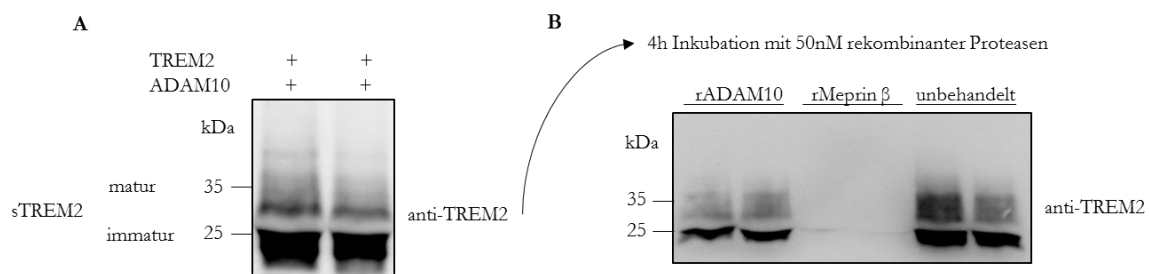


Abbildung 10:

**Rekombinantes Meprin beta spaltet sTREM2.** (A) Überstände von TREM2 und ADAM10 überexprimierenden Zellen wurden gesammelt und mit Concanavalin-A gefällt. Doppelbanden für sTREM2 sind auf die Überexpression zurückzuführen, welche sich in einer vermehrten Bildung des immaturren TREM2 bemerkbar macht. (B) Die gesammelten Überstände wurden mit rekombinanten Ektodomänen der Proteasen Meprin beta und ADAM10 bei 37 °C für 4h inkubiert und anschließend ebenfalls mit Concanavalin-A gefällt. Es zeigt sich eine deutliche Reduktion des sTREM2 in der Inkubation mit rekombinantem Meprin beta, wobei keine weiteren Spaltfragmente zu identifizieren waren. Repräsentative Darstellung von jeweils zwei nebeneinandergestellten biologischen Replikaten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Nach vierstündiger Inkubation des Überstandes von ADAM10 und TREM2 überexprimierenden Zellen mit 50 nM der aktivierten rekombinanten Ektodomäne des Meprin beta zeigt sich eine fast vollständige Degradierung des sTREM2 (s. Abb. 10). Im Acrylamidgel (14%) sind keine weiteren Spaltfragmente zu detektieren. Die Inkubation des sTREM2 mit 50 nM der rekombinanten Ektodomäne des ADAM10 führte zu keiner weiteren Degradierung.

Um zu untersuchen ob die rekombinanten Ektodomänen des Meprin alpha, Meprin beta und ADAM10 auch einen proteolytischen Einfluss auf membranständiges *Full-length* TREM2 haben, wurde in HEK293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen TREM2 transient überexprimiert. Anschließend

substituierten wir die rekombinanten Ektodomänen der Proteasen zum Medium. Auch die Level von membranständigem TREM2 reduzierten sich erheblich nach Inkubation mit rekombinantem Meprin beta.

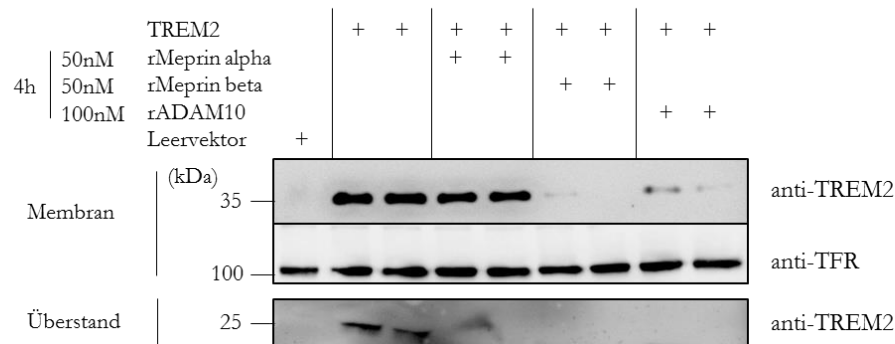


Abbildung 11:

**Inkubation von HEK293T ADAM 10/17 <sup>-/-</sup> Zellen mit rekombinanten Ektodomänen der Proteasen Meprin alpha, Meprin beta und ADAM 10.** TREM2 wurde transient überexprimiert und die Zellen anschließend für 4h mit rekombinanten Proteasen inkubiert. Membranständiges TREM2 ist nach der Inkubation mit rekombinantem Meprin beta kaum noch nachweisbar. Auch rekombinantes ADAM10 ist in der Lage membranständiges TREM2 zu prozessieren. Repräsentative Darstellung von jeweils zwei nebeneinandergestellten biologischen Replikaten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

Das Signal für *Full-length* TREM2 auf der Zellmembran reduziert sich deutlich nach vierstündiger Inkubation mit rekombinantem Meprin beta wie auch nach Inkubation mit rekombinantem ADAM10 (Abb. 11). Für Meprin alpha ist dieser Effekt nicht zu beobachten. Um den Zeitpunkt der Spaltung des TREM2 durch rekombinantes Meprin beta an der Zelloberfläche näher zu definieren, dokumentierten wir die Degradation des TREM2 in einer Zeitreihe (s. Abb. 12).

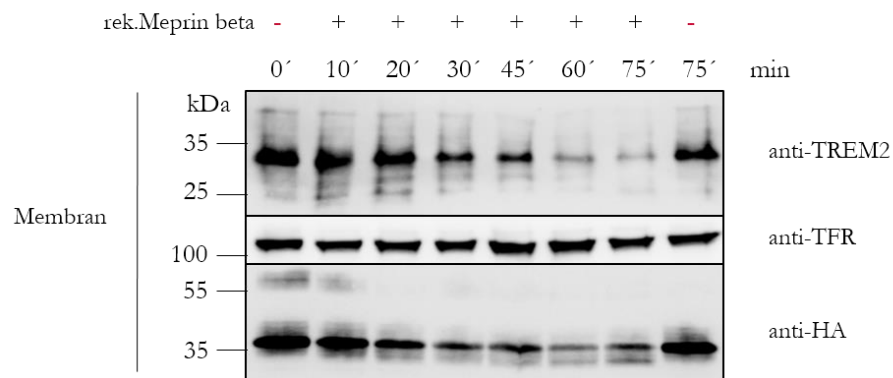


Abbildung 12:

**Zeitreihe der Degradation des membrangebundenen TREM2 durch die rekombinante Ektodomäne des Meprin beta.** HEK293T ADAM 10/17 <sup>-/-</sup> Zellen wurden erneut mit TREM2 transfiziert und anschließend mit rekombinantem Meprin beta inkubiert. Zeitangaben in Minuten. TREM2 in Membranfraktionen ist dargestellt über einen polyklonalen TREM2-AK und einen monoklonalen HA-AK, welcher den N-Terminus detektiert. Die Degradation des TREM2 ist nach 20min bereits deutlich sichtbar.

In der Zeitreihe ergab sich ein rasches Einsetzen der Degradation von TREM2 durch die rekombinante Ektodomäne des Meprin beta (Abb. 12). Nach zwanzigminütiger Inkubation setzt die Degradation deutlich ein und hinterlässt nach 60min ein kaum noch detektierbares Signal für TREM2 in der Western-Blot-Analyse.

### 3.1.4 Das Shedding des TREM2 durch Meprin beta beeinträchtigt die Phagozytose

Als System für die quantitative Beurteilung der Phagozytose wurden THP-1-Zellen genutzt. Die THP-1 Monozyten können durch Induktion mit 4-beta-Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) zu einem Makrophagen-ähnlichen-Phänotyp differenzieren (Daigneault *et al.*, 2010). Auch die HEK 293T ADAM10/17 <sup>-/-</sup> Zellen wurden für selbigen Versuch genutzt, da auch diese ein hohes Maß an Phagozytose aufwiesen (Kleinberger *et al.*, 2014). Für das *Downstream-Signalling* des TREM2 ist das DAP12 (*Tyrosine kinase binding protein, TYROBP*) essenziell. Da HEK293T Zellen dieses Protein nicht endogen exprimieren, nutzten wir für diesen Versuch TREM2/DAP12-Fusionskonstrukte (Kleinberger *et al.*, 2014) (s. Abb. 13). Die Plasmide hierfür wurden uns freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. Christian Haass und Dr. Gernot Kleinberger (Deutsches Zentrum für Neurodegenerative Erkrankungen, DZNE München) überlassen. Die Überexpression von Meprin beta führte in unseren Versuchen zu einer drastischen Reduktion der TREM2-induzierten Steigerung der Phagozytose.

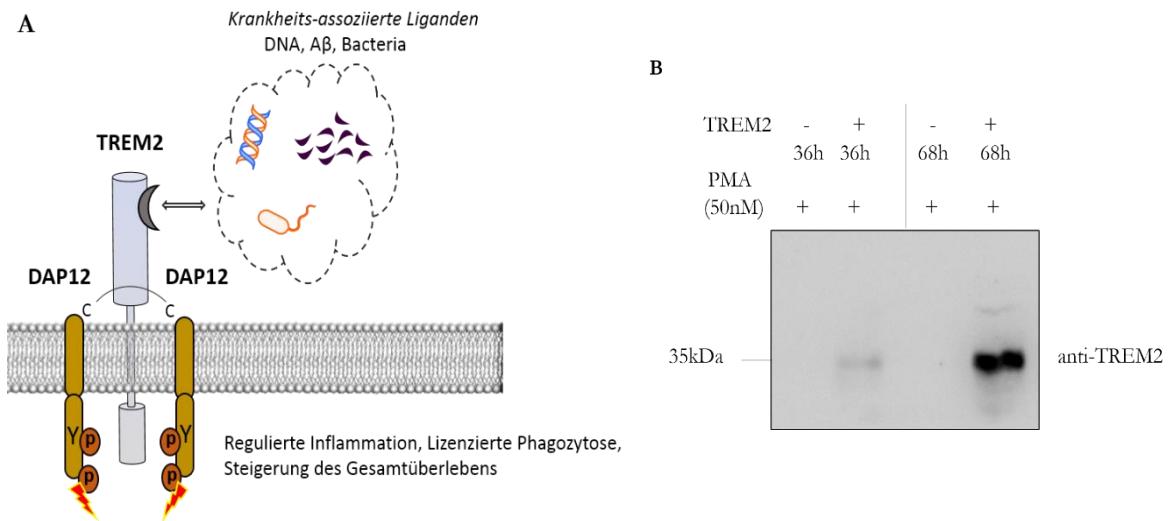


Abbildung 13:

**Transfektion und Differenzierung von THP-1 Zellen. (A)** Schematische Darstellung der Interaktion zwischen TREM2 und DAP12. **(B)** THP-1 Zellen wurden mit PMA differenziert und gleichzeitig transfiziert. Nach 68h zeigten sie eine gute Expressionsrate der transfizierten Proteine. Nach 72h wurde der Phagozytoseassay durchgeführt (Abb. 14)

THP-1 Zellen, welche TREM2 transient überexprimieren, zeigen eine deutlich gesteigerte Phagozytoseleistung (Abb. 14). Gleichzeitige Überexpression von Meprin beta zeigt in diesem System eine erhebliche Reduktion der Phagozytoseleistung. Dies lässt sich durch die Prozessierung der Ektodomäne des TREM2 erklären, welche somit nicht mehr als Rezeptor an der Zelloberfläche fungiert. Da die Stimulation der Zellen mit PMA die Aktivität der endogenen Proteasen der ADAM-Familie steigert, stellt sich die Frage ob sich der Einfluss des überexprimierten ADAM10 in diesem Kontext beurteilen lässt. Die Behandlung der TREM2 überexprimierenden Makrophagen mit den rekombinanten Ektodomänen der Proteasen Meprin beta und ADAM10 liefert in diesem System keine signifikante Reduktion der Phagozytose.

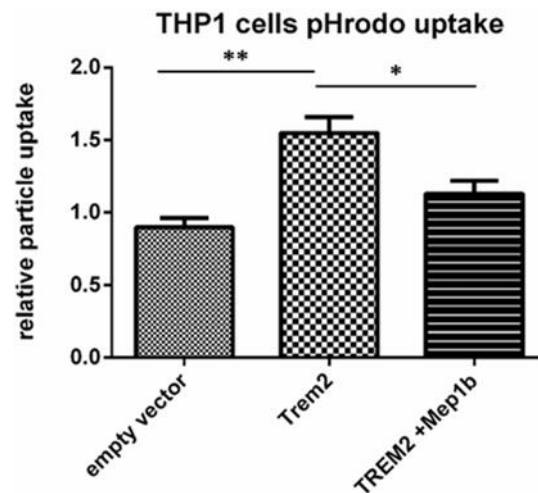


Abbildung 14:

**FACS-Analyse des Phagozytoseassays mit *pHrodo green* (Thermo Scientific) in THP-1 Makrophagen.**

Durch Überexpression des TREM2 steigerte sich die Phagozytose der THP-1 Zellen nahezu um das Doppelte. Bei gleichzeitiger Überexpression von Meprin beta reduzierte sich die Phagozytose signifikant ( $n=4$ ). Die Daten wurden über eine *one-way-Anova* mit einem Newman-Keuls Post-hoc *Two-way-Comparison-Test* ausgewertet und repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

Im HEK-Zellsystem wurden TREM2/DAP12 Fusionskonstrukte anstelle des TREM2 überexprimiert (s. Abb. 15 A), da HEK-Zellen kaum über endogenes DAP12 verfügen. Auch hier wurde der Effekt der Proteasen Meprin beta und ADAM10 auf das quantitative Niveau der Phagozytose untersucht. Auffällig wurde auch in diesem Versuch eine gesteigerte Phagozytose nach Überexpression von TREM2/DAP12, welche durch gleichzeitige Überexpression von ADAM10 und Meprin beta drastisch reduziert werden konnte (s. Abb 16). Die proteolytische Prozessierung der TREM2/DAP12 Fusionskonstrukte verhält sich entsprechend der des TREM2. In gleichzeitiger Überexpression mit Meprin beta und ADAM 10 fand sich eine deutliche Reduktion des glykosylierten *Full-length* Konstrukts an der Zellmembran (s. Abb. 15 B).

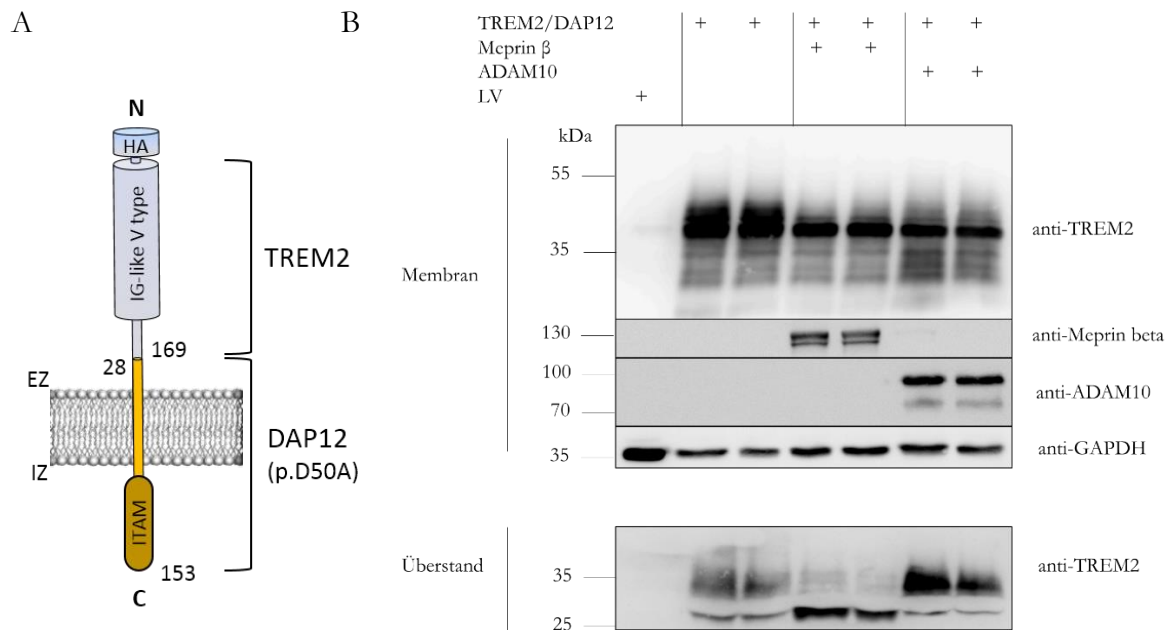


Abbildung 15:

**TREM2/DAP12 Fusionskonstrukte.** (A) TREM2/DAP12 (Hamerman *et al.*, 2006) mit dem Austausch eines Aspartatrests zu einem Alanin in der Transmembrandomäne des DAP12 (p.D50A) und einem N-terminalen HA-Tag (Kleinberger *et al.*, 2014) (B) Kontrollblot der FACS-Analyse (Abb. 16). Transiente Überexpression in HEK293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen. Die proteolytische Spaltung der TREM2/DAP12 Fusionskonstrukte gleicht derer von TREM2 (Abb. 9). Die Reduktion des muren TREM2 an der Zellmembran durch Co-Expression von Meprin beta und der einhergehende Verlust des sTREM2 im ÜS werden deutlich. Repräsentative Darstellung von jeweils zwei nebeneinandergestellten biologischen Replikaten aus mindestens 3 unabhängigen Experimenten.

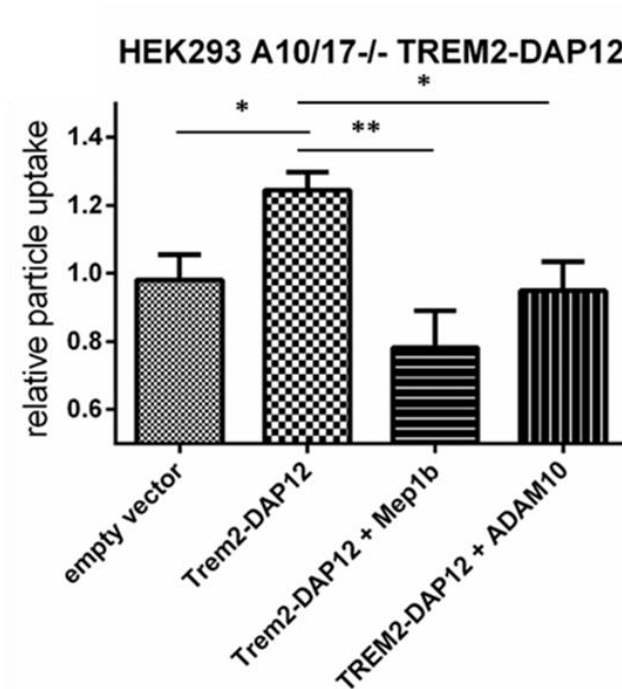


Abbildung 16:

**FACS-Analyse des Phagozytoseassays mit *pHrodo green* (Thermo Scientific) in HEK293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> mit TREM2/DAP12.** Durch transiente Überexpression der TREM2/DAP12 Fusionskonstrukte kommt es zu einer quantitativ gesteigerten Phagozytose. Gleichzeitige Überexpression von ADAM10 reduziert diese signifikant. Meprin beta reduziert die Phagozytose deutlich über den Effekt des TREM2/DAP12 hinaus.  $n=8-9$ , Inhibitor  $n=4-5$ . Expressionskontrollen in Abb. 15. Die Daten wurden über eine *one-way-Anova* mit einem Newman-Keuls Post-hoc *Two-way-Comparison-Test* ausgewertet und repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ .

### 3.1.5 Ko-Lokalisation von Meprin beta und TREM2 an der Zellmembran

Nach Ko-Transfektion von Meprin beta und TREM2 in HEK 293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen, wurden diese fixiert (2.2.8) und unter einem konfokalen *Laser-Scanning*-Mikroskop betrachtet. Um die Western-Blot-Ergebnisse über die Interaktion der beiden Proteine weiter zu bestätigen, versuchten wir eine Ko-Lokalisation von Meprin beta und TREM2 an der Zellmembran zu detektieren. TREM2 wurde hierfür über den anti-HA-AK markiert und Meprin beta über den anti-Meprin beta (Tier2)-AK. Meprin beta und Trem2 ko-lokalisieren in transient überexprimierenden HEK293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> an der Zellmembran (Abb. 17). Beide Proteine zeigen eine intrazelluläre Akkumulation, welche auf die Überexpression zurückzuführen ist.

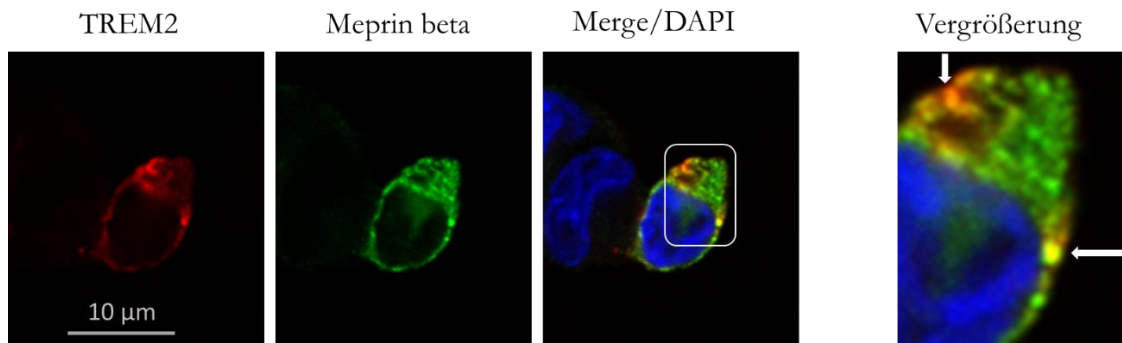


Abbildung 17:

**Ko-Immunfluoreszenz von Meprin beta und TREM2 in HEK293T ADAM10/17<sup>-/-</sup> Zellen.** TREM2 wurde mit dem anti-HA AK markiert, Meprin beta mit dem anti-Meprin beta (Tier2) AK. Die weiße Box markiert den rechts vergrößerten Bildausschnitt. Weiße Pfeile im vergrößerten Ausschnitt betonen Positionen mit besonders starker Ko-Lokalisation von Meprin beta und TREM2. Vergrößerung 1000<sup>x</sup>. n=6

### 3.2 TREM2 akkumuliert in primären Makrophagen aus Meprin beta<sup>-/-</sup> Mäusen

#### 3.2.1 Meprin beta prozessiert TREM2 in primären murinen Makrophagen

Zur Beurteilung der *in vivo* Relevanz bezüglich der Prozessierung von TREM2 durch die Metalloprotease Meprin beta wurden Zellen aus Meprin beta<sup>-/-</sup> Mäusen (Norman *et al.*, 2003) mit Wildtyp-Kontrolltieren verglichen. Primäre murine Makrophagen wurden feinpräpariert (2.2.10) und anschließend in Kultur gehalten. Für die Analyse im Western Blot wurden Zelllysate erstellt und Überstände gesammelt. Proben wurden auf 10-14% Acrylamidgele aufgetragen und wie beschrieben verarbeitet. Zusätzlich wurden Überstände von Zellschalen mit Lipopolysacchariden (LPS) aus *E.coli* Bakterien versetzt. Es ist bekannt, dass Stimulation mit LPS die Aktivität der ADAM-Proteasen steigern kann (Killar *et al.*, 1999). Es zeigte sich eine deutliche Akkumulation von TREM2 in Meprin beta<sup>-/-</sup> Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren (s. Abb. 18). Antikörper für die Western-Blot-Analyse (Clone 5F4, Clone 14D1) wurden freundlichst von Prof. Dr. Dr. Christian Haass und Dr. Gernot Kleinberger (DZNE) bereitgestellt.



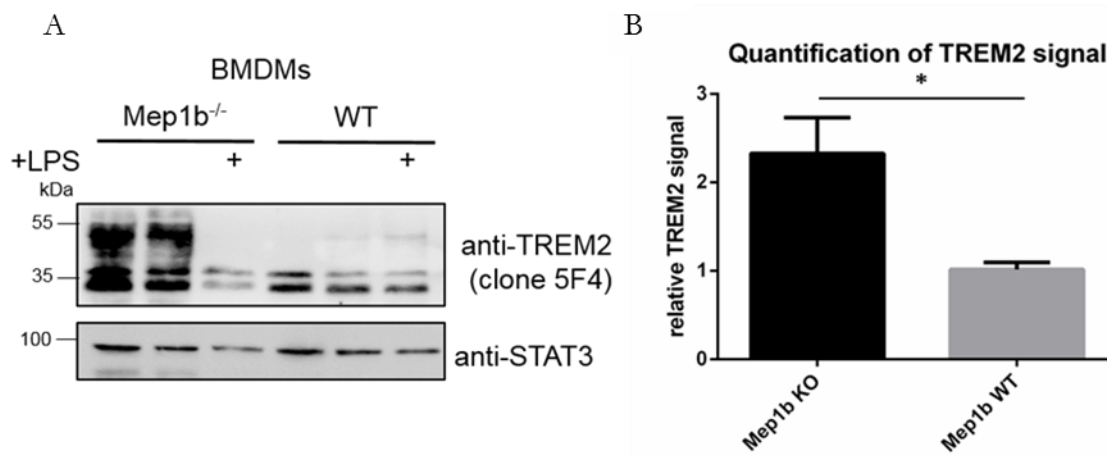


Abbildung 18:

**TREM2 akkumuliert in BMDM aus Meprin beta <sup>-/-</sup> Mäusen. (A)** Zelllysate von Meprin beta *knock-out* (Mep1b<sup>-/-</sup>) Tieren demonstrieren erhöhte TREM2 Signale verglichen zum Wildtyp. Matures TREM2 bei etwa 45 kDa findet sich nahezu ausschließlich in Meprin beta <sup>-/-</sup> Tieren. Nach LPS-Stimulation kommt es auch in Meprin beta <sup>-/-</sup> Tieren zu einer erheblichen Reduktion der Signalstärke von TREM2 mit dem Verlust der maturen Form bei 45 kDa. Als Ladekontrolle diente STAT3. **(B)** Die Quantifizierung der Signalstärke reflektiert die erhöhten TREM2 Signalstärken in Meprin beta <sup>-/-</sup> Tieren. *n*=3

Die Lysate der BMDM von Meprin beta <sup>-/-</sup> Mäusen weisen deutlich höhere Mengen an TREM2 verglichen mit denen aus wildtypischen Tieren auf. Vor allem die vollständig glykosylierte Form des TREM2 ist in Meprin beta Wildtyp-Mäusen praktisch nicht nachweisbar. Das glykosylierte TREM2 bei 45 kDa ist als die mature Form an der Zelloberfläche zu betrachten. Doppelbanden bei 35 kDa reflektieren TREM2, welches sich im endoplasmatischen Retikulum oder auf dem sekretorischen Weg befindet. Nach LPS-Stimulation kommt es zu einem Verlust des Signals für das mature TREM2 in Meprin beta <sup>-/-</sup> Mäusen. Dies lässt sich durch eine Aktivierung der ADAM-Proteasen erklären. In Meprin beta Wildtyp-Mäusen ist das mature TREM2 kaum durch Western-Blotting nachweisbar.

### 3.2.2 Makrophagen aus Meprin beta<sup>-/-</sup> Mäusen haben eine erhöhte Phagozytosekapazität

Eine Verminderung des murenen TREM2 durch Meprin beta korrelierte auch in Primären murinen Makrophagen mit einer verringerten Phagozytoseleistung. Kultivierte *bone marrow derived macrophages* (BMDM) aus Meprin beta<sup>-/-</sup> Mäusen und Kontrolltieren wurden ebenfalls auf das quantitative Maß ihrer Phagozytose untersucht. Hierbei demonstrierten die Makrophagen der Tiere mit dem exprimierten Meprin beta-Wildtyp eine verminderte relative Partikelaufnahme im Vergleich zu den Makrophagen, welche aus den Meprin beta<sup>-/-</sup> Tieren gewonnen wurden (s. Abb. 19).

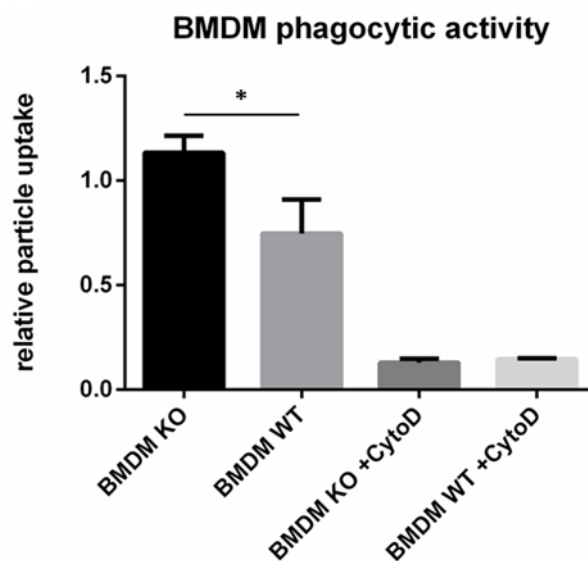


Abbildung 19:

**FACS-Analyse des Phagozytoseassays mit *pHrodo green* (Thermo Scientific).** Makrophagen aus Meprin beta<sup>-/-</sup> Tieren weisen eine erhöhte Phagozytose im Vergleich zu wildtypischen Makrophagen auf. Expressionskontrollen in Abb. 18. Als Negativkontrolle sind mit dem Inhibitor Cytochalasin-D behandelte Makrophagen dargestellt.  $n=3$ . Die Daten wurden über eine *one-way-Anova* mit einem Newman-Keuls Post-hoc *Two-way-Comparison-Test* ausgewertet und repräsentieren die Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung. \* $p<0.05$ .

## 4 Diskussion

### 4.1 Meprin beta ist ein proteolytischer Regulator des TREM2

Zur Untersuchung der *in vitro* Prozessierung des TREM2 durch Meprin beta nutzten wir ein Zellsystem, welches defizient für die Proteasen ADAM10 und ADAM17 war. Diese wurden bereits als Sheddasen des TREM2 identifiziert (Kleinberger *et al.*, 2014) und sind ebenfalls als Sheddasen des Meprin beta selbst bekannt (Hahn *et al.*, 2003; Jefferson *et al.*, 2013). Die Defizienz von ADAM10/17 im verwendeten HEK293T-Zellsystem erleichterte uns so die Beurteilung der ermittelten Ergebnisse, welche mit Hilfe einer ADAM10-retransfizierten Kontrollprobe verglichen wurden. Um Hinweise auf die *in vivo* Prozessierung des TREM2 zu erhalten, verglichen wir Ergebnisse Primärer muriner Makrophagen aus Meprin beta <sup>-/-</sup> Mäusen mit denen wildtypischer Tiere.

Obwohl Meprin alpha eng mit dem Meprin beta verwandt ist (Broder and Becker-Pauly, 2013) und ebenfalls eine Spezifität für negativ geladene Aminosäuren in der P1'-Position aufweist (Becker-Pauly *et al.*, 2011), zeigte Meprin alpha keine proteolytische Aktivität gegenüber dem TREM2. Dies lässt sich ebenfalls bei der proteolytischen Prozessierung des APP beobachten, in welcher das Meprin beta, jedoch nicht das Meprin alpha, als eine  $\beta$ -Sekretase fungiert (Bien *et al.*, 2012). Das Shedding des TREM2 durch Meprin beta unterscheidet sich in wesentlichen Aspekten von dem Shedding durch ADAM 10 (Abb. 9 B). Die nach dem Shedding verbleibenden C-terminalen Fragmente lassen sich nicht durch Inhibition der  $\gamma$ -Sekretase anreichern. Unsere Arbeitsgruppe ermittelte über massenspektrometrische Verfahren die von Meprin beta genutzte Schnittstelle, welche zwischen einem Arginin in Position 136 und einem Aspartat in Position 137 liegt. ADAM10 schneidet das TREM2 prädominant zwischen einem Histidin in Position 157 und einem Serin in Position 158 (Thornton *et al.*, 2017). Meprin beta prozessiert das TREM2 somit deutlich weiter N-terminal und hinterlässt somit größere C-terminale Fragmente an der Zellmembran, welche für die weitere Spaltung durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex ungeeignet sein könnten.

Das Shedding der TREM2-Ektodomäne durch Meprin beta resultiert nicht in einer Anreicherung des sTREM2 im Überstand. Es findet sich sogar ein schwächeres Signal verglichen mit der Kontrolle ohne Co-Expression des Meprin beta. Wir haben in weiteren Versuchen demonstriert, dass TREM2 und sTREM2 von der rekombinanten Ektodomäne des Meprin beta degradiert werden können (Abb. 10, 11, 12). Grundsätzlich ist Meprin beta nicht dafür bekannt seine Substrate zu degradieren. So ist der IL-6R ein Substrat des Meprin beta, die lösliche Form des

IL-6R (sIL-6R) wird jedoch von der rekombinanten Ektodomäne des Meprin beta nicht weiter prozessiert (Arnold *et al.*, 2017). Meprin beta reduziert somit zum einen das TREM2 an der Zelloberfläche und gleichzeitig das sTREM2 im Extrazellularraum. Diese Ergebnisse konnten durch die *ex vivo* Experimente mit *bone marrow derived macrophages* (BMDM) aus Meprin beta <sup>-/-</sup> Mäusen bestätigt werden. Dem sTREM2 wird ebenfalls eine Rolle als *Signalling*-Molekül zugeschrieben (Wu *et al.*, 2015; Zhong, X. F. Chen, *et al.*, 2017). Es soll ebenfalls als potentieller Biomarker im Liquor cerebrospinalis zur Früherkennung und Risikoabwägung von neurodegenerativen Erkrankungen dienen (Suárez-calvet *et al.*, 2016). In den zitierten Studien schlussfolgerte man jedoch nur, dass eine inkorrekte Expression des TREM2 an der Zelloberfläche mit einem geringeren Anteil an sTREM2 im Liquor korreliert. Eine weitere proteolytische Prozessierung des sTREM2 wurde hier nicht in Betracht gezogen. Die Beurteilung von sTREM2 als Biomarker ist somit aus klinischer Sicht fragwürdig. Das Niveau an sTREM2 im Liquor ist offenbar neben der ADAM10 vermittelten Spaltung ebenfalls abhängig von der Expressionsrate des Meprin beta und weiteren Proteasen. Gleichmaßen ist anzumerken, dass bereits etablierte Nachweisverfahren das von Meprin beta weiter N-terminal prozessierte sTREM2 nicht erkennen können. Natürlich wäre eine individuelle Verlaufskontrolle möglich, welche jedoch mit wiederholten Liquorentnahmen einhergehen würde. Die Indikation wäre auf Grund der nicht unerheblichen Gesundheitsrisiken einer intrathekalen Punktion jedoch streng zu prüfen.

Ist TREM2 nicht korrekt an der Zelloberfläche exprimiert, kann dies die Grundlage für mehrere neurodegenerative Pathologien sein. So resultiert beispielsweise die Expression der Punktmutation p.T66M in einer Akkumulation von immatorem TREM2. Dies führt zu massiven Einschränkungen in der Funktion der Mikroglia (Mazaheri *et al.*, 2017). Andere Mutationen, wie p.R47H, resultieren in einer eingeschränkten Bindungskapazität für Liganden, wie zum Beispiel von Aβ-Peptiden (R. Guerreiro, Wojtas, *et al.*, 2013). Nachdem ein Zusammenhang zwischen dem Funktionsverlust des TREM2 und einer verminderten Phagozytose hergestellt wurde (Takahashi, Rochford and Neumann, 2005), bedienten sich Forschergruppen der Phagozytose als *Read-Out* eines TREM2-Funktionsverlustes. Sowohl Mutationen mit einhergehend verminderter Expression auf der Zellmembran, wie auch ein verstärkte proteolytische Prozessierung führen zu einer Verminderung der Phagozytosekapazität (Kleinberger *et al.*, 2014). Ein Einfluss auf die spezifische Phagozytose von Aβ-Plaques konnte nachgewiesen werden, ist jedoch altersabhängig und geringer ausgeprägt als angenommen (Wang *et al.*, 2015; Jay *et al.*, 2017). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass der Effekt von TREM2 weit über die Modulation der Phagozytose hinausgeht. Im Gegensatz zu den *in vivo* Beobachtungen, ist der Effekt von TREM2 auf die Phagozytosekapazität im

überexprimierenden Zellsystem deutlich ausgeprägter und eignet sich zur Beurteilung der Menge von maturem TREM2 an der Zelloberfläche. Die Expression von Meprin beta in Makrophagen wurde nachgewiesen und ist verknüpft mit wichtigen Einflüssen auf die Migration dieser Zellen, sowie auf proinflammatorische Stimuli (Crisman *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2014). Wir analysierten den Einfluss von Meprin beta und TREM2 auf die Phagozytose in monozytären Zelllinien und beobachteten außerdem eine verstärkte Phagozytose in BMDM aus Meprin beta <sup>-/-</sup> Tieren verglichen mit Zellen aus wildtypischen Tieren. Diese Beobachtungen sind Hinweise auf eine Korrelation zwischen der Expression von Meprin beta und der Menge von TREM2 auf der Zelloberfläche und verknüpfen die Expression von Meprin beta mit dem phagozytischen Potential von Makrophagen *in vivo*. Nicht vollständig auszuschließen ist der Einfluss von Meprin beta auf weitere Adhäsionsmoleküle und Rezeptoren (Huguenin *et al.*, 2008), sowie eine veränderte Migration der Zellen (Bedau *et al.*, 2017). Meprin beta nimmt jedoch neben der Modulation der Phagozytose weitere Einflüsse auf chronisch entzündliche und akut entzündliche Erkrankungen. So ist Meprin beta mit der Entstehung chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, sowie dem Verlauf akuter Kolitiden assoziiert (Müller *et al.*, 2011; Vazeille *et al.*, 2011). Neben einer Veränderung der transendothelialen Zellmigration durch Shedding des Oberflächenproteins CD99 in Entzündungsreaktionen (Bedau *et al.*, 2017), beeinflusst Shedding des IL-6R durch Meprin beta das proinflammatorische *Trans-Signalling* (Arnold *et al.*, 2017). Des Weiteren spaltet Meprin beta das Chemokin CCL2/MCP-1, welches an der Rekrutierung mononukleärer Zellen zum Ort des Entzündungsgeschehens beteiligt ist (Herzog *et al.*, 2016).

Zusammengefasst konnte wir demonstrieren, dass Meprin beta TREM2 von der Zelloberfläche spaltet und degradiert, sowie TREM2 Level auf Makrophagen kontrolliert. In Abwesenheit von Meprin beta weisen monozytäre Zellen ein erhöhtes phagozytisches Potential auf. Es sei anzumerken, dass dieser Effekt nicht unbedingt auf Meprin beta exprimierende Zellen beschränkt ist, da die lösliche und die membrangebundene Variante des Meprin beta TREM2 proteolytisch prozessieren. Das von ADAM10 generierte sTREM2 unterscheidet sich quantitativ und qualitativ von dem des durch Meprin beta generiertem sTREM2. Interferenzen mit bereits etablierten Methoden des Nachweises von sTREM2 in Liquor cerebrospinalis und Blutseren sind daher anzunehmen. In TREM2 assoziierten Pathologien sollten diese Erkenntnisse berücksichtigt werden.

## 4.2 Ist das TREM2-Cleavage durch Meprin beta ein Risikofaktor für die Entwicklung der Alzheimer-Erkrankung?

Die Prozessierung des APP durch BACE-1 ( *$\beta$ -site APP-cleaving enzyme*) über den Amyloiden *Pathway* (Abb. 4) führt zur Generierung von Amyloiden Plaques (A $\beta$ -Plaques). Die Akkumulation dieser Plaques ist ein wesentliches Charakteristikum der Alzheimer-Erkrankung. Meprin beta prozessiert das APP nahezu analog zum BACE-1, generiert dabei jedoch verschiedene A $\beta$ -Spezies mit verschiedenen Spaltstellen, welche entweder identisch mit der des BACE-1 sind oder proximal hiervon lokalisiert sind (Bien *et al.*, 2012). So entstehen N-terminal verkürzte A $\beta$ -Varianten, welche ein Alanin an der p1'-Position enthalten (A $\beta^{2-40}$ ) und eine höhere Anfälligkeit zur Bildung von Aggregaten aufweisen (Schönherr *et al.*, 2016). Diese Varianten konnten bereits in Analysen humanen Liquor cerebrospinalis nachgewiesen werden (Wiltfang *et al.*, 2001; Bibl *et al.*, 2012). Prozessierung des APP durch Meprin beta (Abb. 5) führt ebenfalls zur Entstehung von zwei N-terminalen Fragmenten mit Größen von 11 und 22 kDa, welche bereits in humanen Hirnlysaten detektiert werden konnten (Portelius *et al.*, 2009, 2010). Die Überexpression von Meprin beta im Hirn von Alzheimer-Patienten ist ein weiterer Hinweis auf eine Beteiligung der Protease an der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung (Bien *et al.*, 2012). Die in dieser Arbeit gezeigte proteolytische Prozessierung des TREM2 durch Meprin beta liefert Hinweise auf eine komplexere Beteiligung der Protease an der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit, welche über die Produktion von A $\beta$ -Peptiden hinausgeht. Eine Expression von Meprin beta auf monozytären Zellen ist bekannt (Sun, Jin and Bond, 2009). Mikroglia sind die Repräsentanten des Mononukleär-Phagozytären-Systems (MPS) und somit die residenten Makrophagen des zentralen Nervensystems. Sie gehen aus denselben Vorläuferzellen hervor, wie die Makrophagen außerhalb des ZNS. Wir konnten in dieser Arbeit demonstrieren, dass der *Knockout* von Meprin beta einen erheblichen Einfluss auf das Niveau des TREM2 an der Zelloberfläche von primären murinen Makrophagen hat und ihre Phagozytosekapazität einschränkt. In der Alzheimer-Erkrankung nehmen die Mikroglia eine Schlüsselrolle ein. Sie sind verantwortlich für die Phagozytose apoptotischer Neuronen, A $\beta$ -Plaques und zellulärem Debris. Des weiteren modulieren sie die Inflammation und sind an diversen Stoffwechselvorgängen beteiligt. Mikroglia haben eine hohe Expression an TREM2 (Butovsky *et al.*, 2013), was essentiell für eine physiologische Funktion dieser Zellen ist (Mazaheri *et al.*, 2017; Ulland *et al.*, 2017). Die proteolytische Spaltung des TREM2 durch Meprin beta führte zu einem Funktionsverlust des Rezeptors. Ein Funktionsverlust, welcher äquivalent ist zu einem Funktionsverlust durch *Missense* oder *Loss-of-function* Mutationen im TREM2-Gen. Meprin beta trägt somit nicht nur über die Produktion von toxischen A $\beta$ -Peptiden

zur Pathogenese der Alzheimer-Krankheit bei, sondern beeinträchtigt außerdem die inflammatorische Antwort auf die entstandenen A $\beta$ -Plaques und führt zu einer Verminderung der Abräumung dieser Plaques. Es ist davon auszugehen, dass die A $\beta$ -Plaques keinen direkten neurotoxischen Effekt ausüben, sondern erst ihre lange Verweildauer in Verbindung mit einer dysregulierten inflammatorischen Antwort einen toxischen Effekt auf benachbarte Neuronen ausüben.

## 5 Zusammenfassung

Diese Arbeit demonstriert, dass die Metalloprotease Meprin beta in der Lage ist den Zelloberflächenrezeptor TREM2 proteolytisch zu spalten. TREM2 wird vor allem von Monozyten/Makrophagen exprimiert und kann über Bindung von anionischen Liganden, oder nach Stimulation durch benachbarte Rezeptoren, die Immunantwort modulieren. Mikroglia, welche die Repräsentanten des Mononukleären-Phagozytären Systems (MPS) im Zentralnervensystem sind, zeigen eine hohe Expression des TREM2. So erregte der Rezeptor Aufsehen im Kontext neurodegenerativer Erkrankungen. In der Tat konnten diverse Korrelationen zwischen Mutationen des TREM2 und neurodegenerativen Erkrankungen hergestellt werden. Die prominenteste unter diesen Erkrankungen ist die Alzheimer-Erkrankung, in welcher der Funktionsverlust des TREM2 gleich mit mehreren Prozessen der Pathogenese in Verbindung gebracht wird. In unseren Experimenten demonstrierten wir die proteolytische Spaltung des TREM2 durch Meprin beta in mehreren Zellsystemen. Ein Mausmodell, mit einem Gen-Knockout für Meprin beta, wies erhöhte Mengen an TREM2 auf monozytären Zellen auf. Um die Reduktion des TREM2 auf der Zelloberfläche auch qualitativ beurteilen zu können, bedienten wir uns des regulatorischen Einflusses des TREM2 auf die Phagozytose. Der Rezeptor ist in der Lage über Bindung extrazellulärer Liganden eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang zu setzen, welche einen steigenden Einfluss auf die Phagozytose der Zelle hat. Die Abspaltung des TREM2 von der Zelloberfläche durch Meprin beta führte experimentell in mehreren Zellsystemen zu einer Reduktion der Phagozytoseleistung. Aus dem Knochenmark gewonnene Makrophagen der Meprin beta k.o. Mäuse veranschaulichten neben erhöhten Mengen an TREM2 ein gesteigertes Maß ihrer Phagozytoseleistung. Dies verdeutlicht, dass Meprin beta diesen Rezeptor so prozessiert, dass er seine Funktionsfähigkeit verliert. TREM2 kann neben seiner membrangebundenen Form auch als lösliches Signalmolekül vorliegen. Diese freie Form wird auch als *soluble* TREM2 (sTREM2) bezeichnet und entsteht entweder nach Abspaltung von der Zellmembran oder wird nach alternativem *Splicing* von der Zelle sekretiert. Auch Meprin beta kann von der Zelloberfläche abgespalten werden und als freie Protease im Extrazellularraum agieren. So konnten wir ebenfalls belegen, dass das sTREM2 sowohl von membrangebundenem Meprin beta, als auch von der löslichen Variante weiter gespalten werden kann. Mäuse mit einer Defizienz für Meprin beta weisen neben erhöhten Mengen des TREM2 an der Zelloberfläche höhere Mengen an sTREM2 im Extrazellularraum auf.



## 6 Literaturverzeichnis

- Arnold, P. *et al.* (2017) 'Meprin Metalloproteases Generate Biologically Active Soluble Interleukin-6 Receptor to Induce Trans-Signaling', *Scientific Reports*, 7(October 2016), p. 44053. doi: 10.1038/srep44053.
- Banerjee, S. *et al.* (2009) 'MEP1A allele for meprin A metalloprotease is a susceptibility gene for inflammatory bowel disease.', *Mucosal immunology*, 2(3), pp. 220–231. doi: 10.1038/mi.2009.3.
- Banerjee, S. *et al.* (2011) 'Balance of meprin A and B in mice affects the progression of experimental inflammatory bowel disease.', *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 300(2), pp. G273–G282. doi: 10.1152/ajpgi.00504.2009.
- Becker-Pauly, C. *et al.* (2007) 'The alpha and beta subunits of the metalloprotease meprin are expressed in separate layers of human epidermis, revealing different functions in keratinocyte proliferation and differentiation.', *The Journal of investigative dermatology*, 127(5), pp. 1115–1125. doi: 10.1038/sj.jid.5700675.
- Becker-Pauly, C. *et al.* (2011) 'Proteomic Analyses Reveal an Acidic Prime Side Specificity for the Astacin Metalloprotease Family Reflected by Physiological Substrates\* □ S', *Molecular & Cellular Proteomics*, pp. 1–19. doi: 10.1074/mcp.M111.009233.
- Bedau, T. *et al.* (2017) 'Ectodomain shedding of CD99 within highly conserved regions is mediated by the metalloprotease meprin ?? and promotes transendothelial cell migration', *FASEB Journal*, 31(3), pp. 1226–1237. doi: 10.1096/fj.201601113R.
- Bertenshaw, G. P., Norcum, M. T. and Bond, J. S. (2003) 'Structure of homo- and hetero-oligomeric meprin metalloproteases: Dimers, tetramers, and high molecular mass multimers', *Journal of Biological Chemistry*, 278(4), pp. 2522–2532. doi: 10.1074/jbc.M208808200.
- Beynon, R. J., Shannon, J. D. and Bond, J. S. (1981) 'Purification and characterization of a metallo-endoproteinase from mouse kidney.', *The Biochemical journal*, 199(3), pp. 591–598.
- Bibl, M. *et al.* (2012) 'Characterization of cerebrospinal fluid aminoterminally truncated and oxidized amyloid- $\beta$  peptides', *Proteomics - Clinical Applications*, 6(3–4), pp. 163–169. doi: 10.1002/prca.201100082.
- Bien, J. *et al.* (2012) 'The Metalloprotease Meprin □ Generates Amino Terminal-truncated Amyloid □ Peptide Species \*', 287(40), pp. 33304–33313. doi: 10.1074/jbc.M112.395608.
- Bond, J. S. and Beynon, R. J. (1995) 'The astacin family of metalloendopeptidases', *Protein Science*, pp. 1247–1261. doi: 10.1002/pro.5560040701.
- Borrioni, B. *et al.* (2014) 'Heterozygous TREM2 mutations in frontotemporal dementia', *Neurobiology of Aging*, 35(4). doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.017.
- Bouchon, A. *et al.* (2001) 'A DAP12-mediated pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells.', *The Journal of experimental medicine*, 194(8), pp. 1111–22. doi: 10.1084/jem.194.8.1111.
- Broder, C. and Becker-Pauly, C. (2013) 'The metalloproteases meprin  $\alpha$  and meprin  $\beta$ : unique enzymes in inflammation, neurodegeneration, cancer and fibrosis.', *The Biochemical journal*, 450(2), pp. 253–64. doi:

10.1042/BJ20121751.

Butovsky, O. *et al.* (2013) 'Identification of a unique TGF- $\beta$ -dependent molecular and functional signature in microglia', *Nature Neuroscience*, 17(1), pp. 131–143. doi: 10.1038/nn.3599.

Cady, J. *et al.* (2014) 'TREM2 variant p.R47H as a risk factor for sporadic amyotrophic lateral sclerosis.', *JAMA Neurology*, 71(4), pp. 449–453. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.6237.

Calsolaro, V. and Edison, P. (2016) 'Neuroinflammation in Alzheimer's disease: Current evidence and future directions', *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 12(6), pp. 719–732. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.010.

Cantoni, C. *et al.* (2015) 'TREM2 regulates microglial cell activation in response to demyelination in vivo', *Acta Neuropathologica*, 129(3), pp. 429–447. doi: 10.1007/s00401-015-1388-1.

Charles, J. F. *et al.* (2008) 'The innate immune response to Salmonella enterica serovar Typhimurium by macrophages is dependent on TREM2-DAP12.', *Infection and immunity*, 76(6), pp. 2439–2447. doi: 10.1128/IAI.00115-08.

Colonna, M. and Wang, Y. (2016) 'TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis.', *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(4), pp. 201–7. doi: 10.1038/nnrn.2016.7.

Crisman, J. M. *et al.* (2004) 'Deletion of the Mouse Meprin  $\beta$  Metalloprotease Gene Diminishes the Ability of Leukocytes to Disseminate through Extracellular Matrix', *The Journal of Immunology*. doi: 10.4049/jimmunol.172.7.4510.

Cuyvers, E. *et al.* (2014) 'Investigating the role of rare heterozygous TREM2 variants in Alzheimer's disease and frontotemporal dementia', *Neurobiology of Aging*, 35(3). doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.09.009.

Daigneault, M. *et al.* (2010) 'The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and', 5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008668.

Daws, M. R. *et al.* (2003) 'Pattern recognition by TREM-2: binding of anionic ligands.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 171(2), pp. 594–9. doi: 10.4049/jimmunol.171.2.594.

Ferri, C. P. *et al.* (2005) 'Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study', *The Lancet*, 366(9503), pp. 2112–2117. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67889-0.

Forabosco, P. *et al.* (2013) 'Insights into TREM2 biology by network analysis of human brain gene expression data', *Neurobiology of Aging*, 34(12), pp. 2699–2714. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.05.001.

Franke, M. *et al.* (2016) 'Human and Murine Interleukin 23 Receptors Are Novel Substrates for A Disintegrin and Metalloproteases ADAM10', 291(20), pp. 10551–10561. doi: 10.1074/jbc.M115.710541.

Golde, T. E., Streit, W. J. and Chakrabarty, P. (2013) 'Alzheimer's disease risk alleles in TREM2 illuminate innate immunity in Alzheimer's disease.', *Alzheimer's research & therapy*, 5(3), p. 24. doi: 10.1186/alzrt178.

Guerreiro, R., Bilgic, B., *et al.* (2013) 'A novel compound heterozygous mutation in TREM2 found in a Turkish frontotemporal dementia-like family', *Neurobiology of Aging*, 34(12). doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.06.005.

Guerreiro, R., Wojtas, A., *et al.* (2013) 'TREM2 variants in Alzheimer's disease.', *The New England journal of medicine*, 368(2), pp. 117–27. doi: 10.1056/NEJMoa1211851.

- Guerreiro, R. J. *et al.* (2013) 'Using exome sequencing to reveal mutations in TREM2 presenting as a frontotemporal dementia-like syndrome without bone involvement.', *JAMA neurology*, 70(1), pp. 78–84. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.579.
- Hahn, D. *et al.* (2003) 'Phorbol 12-Myristate 13-Acetate-induced Ectodomain Shedding and Phosphorylation of the Human Meprin $\beta$  Metalloprotease', *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), pp. 42829–42839. doi: 10.1074/jbc.M211169200.
- Hamerman, J. A. *et al.* (2006) 'Cutting Edge: Inhibition of TLR and FcR Responses in Macrophages by Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells (TREM)-2 and DAP12'. doi: 10.4049/jimmunol.177.4.2051.
- Herzog, C. *et al.* (2014) 'ADAM10 is the major sheddase responsible for the release of membrane-Associated meprin A', *Journal of Biological Chemistry*, 289(19), pp. 13308–13322. doi: 10.1074/jbc.M114.559088.
- Herzog, C. *et al.* (2016) 'Proteolytic processing and inactivation of CCL2/MCP-1 by meprins', *Biochemistry and Biophysics Reports*. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.08.019.
- Hsieh, C. L. *et al.* (2009) 'A role for TREM2 ligands in the phagocytosis of apoptotic neuronal cells by microglia', *Journal of Neurochemistry*, 109(4), pp. 1144–1156. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.06042.x.
- Huguenin, M. *et al.* (2008) 'The metalloprotease meprin $\beta$  processes E-cadherin and weakens intercellular adhesion', *PLoS ONE*, 3(5). doi: 10.1371/journal.pone.0002153.
- Jay, T. R. *et al.* (2017) 'Disease Progression-Dependent Effects of TREM2 Deficiency in a Mouse Model of Alzheimer's Disease', *The Journal of Neuroscience*, 37(3), pp. 637–647. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2110-16.2017.
- Jefferson, T. *et al.* (2011) 'Metalloprotease meprin $\beta$  generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo', *Journal of Biological Chemistry*, 286(31), pp. 27741–27750. doi: 10.1074/jbc.M111.252718.
- Jefferson, T. *et al.* (2013) 'The substrate degradome of meprin metalloproteases reveals an unexpected proteolytic link between meprin $\beta$  and ADAM10', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70(2), pp. 309–333. doi: 10.1007/s00018-012-1106-2.
- Jiang, T. *et al.* (2014) 'Upregulation of TREM2 Ameliorates Neuropathology and Rescues Spatial Cognitive Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease', *Neuropsychopharmacology*, 39(13), pp. 2949–2962. doi: 10.1038/npp.2014.164.
- Jiang, T. *et al.* (2015) 'Silencing of TREM2 exacerbates tau pathology, neurodegenerative changes, and spatial learning deficits in P301S tau transgenic mice', *Neurobiology of Aging*, 36(12), pp. 3176–3186. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.08.019.
- Jiang, T. *et al.* (2016) 'TREM2 modifies microglial phenotype and provides neuroprotection in P301S tau transgenic mice', *Neuropharmacology*, 105, pp. 196–206. doi: 10.1016/j.neuropharm.2016.01.028.
- Jin, S. C. *et al.* (2014) 'Coding variants in TREM2 increase risk for Alzheimer's disease', *Human Molecular Genetics*, 23(21), pp. 5838–5846. doi: 10.1093/hmg/ddu277.
- Jonsson, T. *et al.* (2013) 'Variant of TREM2 associated with the risk of Alzheimer's disease.', *The New England*

- journal of medicine*, 368(2), pp. 107–16. doi: 10.1056/NEJMoa1211103.
- Killar, L. *et al.* (1999) ‘Adamalysins. A family of metzincins including TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE)’, in *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb07701.x.
- Kiriyama, Y. and Nochi, H. (2015) ‘The function of autophagy in neurodegenerative diseases’, *International Journal of Molecular Sciences*, pp. 26797–26812. doi: 10.3390/ijms161125990.
- Kl?nemann, H. H. *et al.* (2005) ‘The genetic causes of basal ganglia calcification, dementia, and bone cysts: DAP12 and TREM2’, *Neurology*, pp. 1502–1507. doi: 10.1212/01.WNL.0000160304.00003.CA.
- Kleinberger, G. *et al.* (2014) ‘TREM2 mutations implicated in neurodegeneration impair cell surface transport and phagocytosis’, 6(243).
- Kleinberger, G. *et al.* (2017) ‘The FTD-like syndrome causing TREM2 T66M mutation impairs microglia function, brain perfusion, and glucose metabolism’, *The EMBO Journal*, p. e201796516. doi: 10.15252/embj.201796516.
- Klesney-Tait, J., Turnbull, I. R. and Colonna, M. (2006) ‘The TREM receptor family and signal integration.’, *Nature immunology*, 7(12), pp. 1266–1273. doi: 10.1038/ni1411.
- Kober, D. L. and Brett, T. J. (2017) ‘TREM2-ligand interactions in health and disease’, *Journal of Molecular Biology*. Elsevier Ltd, 429(11), pp. 1607–1629. doi: 10.1016/j.jmb.2017.04.004.
- Kronenberg, D. *et al.* (2010) ‘Processing of procollagen III by meprins: new players in extracellular matrix assembly?’, *The Journal of investigative dermatology*, 130(12), pp. 2727–2735. doi: 10.1038/jid.2010.202.
- Li, Y. J. *et al.* (2014) ‘Meprin-?? regulates production of pro-inflammatory factors via a disintegrin and metalloproteinase-10 (ADAM-10) dependent pathway in macrophages’, *International Immunopharmacology*, 18(1), pp. 77–84. doi: 10.1016/j.intimp.2013.11.004.
- Lottaz, D. *et al.* (2011) ‘Enhanced activity of meprin-??, a pro-migratory and pro-angiogenic protease, in colorectal cancer’, *PLoS ONE*, 6(11). doi: 10.1371/journal.pone.0026450.
- Mazaheri, F. *et al.* (2017) ‘TREM2 deficiency impairs chemotaxis and microglial responses to neuronal injury’, *EMBO reports*, p. e201743922. doi: 10.15252/embr.201743922.
- Müller, S. *et al.* (2011) ‘Deficiency for the Metalloproteinase Meprin 1-Beta Enhances Severity of, and Delays Recovery From Acute DSS Colitis’, *Gastroenterology*. doi: 10.1016/s0016-5085(11)62058-1.
- Musiek, E. S. and Holtzman, D. M. (2015) ‘Three dimensions of the amyloid hypothesis: time, space and “wingmen”’, *Nat Neurosci*, 18(6), pp. 800–806. doi: 10.1038/nn.4018.
- N’Diaye, E.-N. *et al.* (2009) ‘TREM-2 (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) is a phagocytic receptor for bacteria.’, *The Journal of cell biology*, 184(2), pp. 215–23. doi: 10.1083/jcb.200808080.
- Norman, L. P. *et al.* (2003) ‘Targeted Disruption of the Meprin  $\alpha$  Gene in Mice Leads to Underrepresentation of Knockout Mice and Changes in Renal Gene Expression Profiles’, 23(4), pp. 1221–1230. doi: 10.1128/MCB.23.4.1221.
- Orr, S. J. and McVicar, D. W. (2011) ‘LAB/NTAL/Lat2: a force to be reckoned with in all leukocytes?’, *Journal of leukocyte biology*, 89(1), pp. 11–9. doi: 10.1189/jlb.0410221.
- Paloneva, J. *et al.* (2001) ‘CNS manifestations of Nasu-Hakola disease: a frontal dementia with bone cysts.’,

- Neurology*, 56(11), pp. 1552–1558. doi: 10.1212/WNL.56.11.1552.
- Paloneva, J. *et al.* (2002) ‘Mutations in two genes encoding different subunits of a receptor signaling complex result in an identical disease phenotype.’, *American journal of human genetics*, 71(3), pp. 656–62. doi: 10.1086/342259.
- Pear, W. S. *et al.* (1993) ‘Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. doi: 10.1073/pnas.90.18.8392.
- Poliani, P. L. *et al.* (2015) ‘TREM2 sustains microglial expansion during aging and response to demyelination’, *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), pp. 2161–2170. doi: 10.1172/JCI77983.
- Portelius, E. *et al.* (2009) ‘Identification of novel APP/Aβ isoforms in human cerebrospinal fluid’, *Neurodegener Dis*, 6(3), pp. 87–94. doi: 10.1159/000203774.
- Portelius, E. *et al.* (2010) ‘Identification of novel N-terminal fragments of amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid’, *Experimental Neurology*, 223(2), pp. 351–358. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.06.011.
- Prox, J., Arnold, P. and Becker-pauly, C. (2015) ‘Meprin α and meprin β : Procollagen proteinases in health and disease’, *Matrix Biology*. International Society of Matrix Biology, pp. 1–7. doi: 10.1016/j.matbio.2015.01.010.
- Puente, X. S. *et al.* (2005) ‘A genomic view of the complexity of mammalian proteolytic systems.’, *Biochemical Society transactions*, 33(November 2004), pp. 331–334. doi: 10.1042/BST0330331.
- Ransohoff, R. M. (2016) ‘How neuroinflammation contributes to neurodegeneration’, *Science*, 353(6301), pp. 777–783. doi: 10.1126/science.aag2590.
- Rayaprolu, S. *et al.* (2013) ‘TREM2 in neurodegeneration: evidence for association of the p.R47H variant with frontotemporal dementia and Parkinson’s disease.’, *Molecular neurodegeneration*, 8, p. 19. doi: 10.1186/1750-1326-8-19.
- Schechter, I. and Berger, A. (1967) ‘On the size of the active site in proteases. I. Papain’, *Biochemical and Biophysical Research Communications*. doi: 10.1016/S0006-291X(67)80055-X.
- Schlepcow, K. *et al.* (2017) ‘An Alzheimer associated TREM2 variant occurs at the ADAM cleavage site and affects shedding and phagocytic function’, pp. 1–10. doi: 10.1038/sj.embor.7400826.
- Schmidt, F. (2016) *Regulation of the metalloprotease meprin β*.
- Schönherr, C. *et al.* (2016) ‘Generation of aggregation prone N- terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site’, *Molecular Neurodegeneration*. Molecular Neurodegeneration, pp. 11–15. doi: 10.1186/s13024-016-0084-5.
- Sterchi, E. E., Green, J. R. and Lentze, M. J. (1982) ‘Non-pancreatic hydrolysis of N-benzoyl-L-tyrosyl-p-aminobenzoic acid (PABA-peptide) in the human small intestine.’, *Clinical science (London, England: 1979)*, 62(5), pp. 557–560.
- Stöcker, W; Zwilling, R. (1995) ‘Astacin’, *Methods Enzymol*, 248, pp. 305–325.
- Suárez-calvet, M. *et al.* (2016) ‘sTREM 2 cerebrospinal fluid levels are a potential biomarker for microglia activity in early-stage Alzheimer ’ s disease and associate with neuronal injury markers’, 8(5), pp. 466–476.
- Sun, Q., Jin, H. J. and Bond, J. S. (2009) ‘Disruption of the meprin α and β genes in mice alters homeostasis

- of monocytes and natural killer cells', *Experimental Hematology*. doi: 10.1016/j.exphem.2008.10.016.
- Takahashi, K., Rochford, C. D. P. and Neumann, H. (2005) 'Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2', *The Journal of Experimental Medicine*, 201(4), pp. 647–657. doi: 10.1084/jem.20041611.
- Thornton, P. *et al.* (2017) 'TREM 2 shedding by cleavage at the H157-S158 bond is accelerated for the Alzheimer's disease-associated H157Y variant', *EMBO Molecular Medicine*. doi: 10.15252/emmm.201707673.
- Tsuchiya, S. *et al.* (1980) 'Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1)', *International Journal of Cancer*. doi: 10.1002/ijc.2910260208.
- Ulland, T. K. *et al.* (2017) 'TREM2 Maintains Microglial Metabolic Fitness in Alzheimer's Disease', *Cell*, 170(4), pp. 649–663.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.07.023.
- Ulrich, J. D. *et al.* (2014) 'Altered microglial response to A $\beta$  plaques in APPPS1-21 mice heterozygous for TREM2', *Molecular Neurodegeneration*, 9(1), p. 20. doi: 10.1186/1750-1326-9-20.
- Vazeille, E. *et al.* (2011) 'Role of meprins to protect ileal Mucosa of Crohn's disease patients from colonization by adherent-invasive e. coli', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0021199.
- Wang, Y. *et al.* (2015) 'TREM2 lipid sensing sustains the microglial response in an Alzheimer's disease model', *Cell*, 160(6), pp. 1061–1071. doi: 10.1016/j.cell.2015.01.049.
- Wang, Y. *et al.* (2016) 'TREM2-mediated early microglial response limits diffusion and toxicity of amyloid plaques', *The Journal of Experimental Medicine*, 213(5), pp. 667–675. doi: 10.1084/jem.20151948.
- Wilkins, M. R. *et al.* (1996) 'Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it.', *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews*, 13(July 2015), pp. 19–50. doi: 10.1080/02648725.1996.10647923.
- Wiltfang, J. *et al.* (2001) 'Elevation of  $\beta$ -Amyloid Peptide 2-42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells', *Journal of Biological Chemistry*, 276(46), pp. 42645–42657. doi: 10.1074/jbc.M102790200.
- Wu, K. *et al.* (2015) 'TREM-2 promotes macrophage survival and lung disease after respiratory viral infection', *The Journal of Experimental Medicine*, 212(5), pp. 681–697. doi: 10.1084/jem.20141732.
- Wunderlich, P. *et al.* (2013) 'Sequential Proteolytic Processing of the Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-2 (TREM2) Protein by Ectodomain Shedding and  $\alpha$ -Secretase-dependent Intramembranous', 288(46), pp. 33027–33036. doi: 10.1074/jbc.M113.517540.
- Yuan, P. *et al.* (2016) 'Erratum: TREM2 Haplodeficiency in Mice and Humans Impairs the Microglia Barrier Function Leading to Decreased Amyloid Compaction and Severe Axonal Dystrophy (Neuron (\*\*\*\*) \*\* (\*\*\*???) (10.1016/j.neuron.2016.05.003) (S0896627316301635))', *Neuron*, pp. 252–264. doi: 10.1016/j.neuron.2016.09.016.
- Zhong, L., Chen, X. F., *et al.* (2017) 'Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances microglial survival', pp. 597–607.
- Zhong, L., Chen, X.-F., *et al.* (2017) 'Soluble TREM2 induces inflammatory responses and enhances

microglial survival', *The Journal of Experimental Medicine*, p. jem.20160844. doi: 10.1084/jem.20160844.

## 7 Anhänge

### 7.1 Danksagung

In erster Linie danke ich meinen Eltern für eine herzliche und bedingungslose Unterstützung über die vergangenen Studienjahre.

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Christoph Becker-Pauly wurde ich überaus freundlich integriert und möchte mich herzlich für die Überlassung des Themas und jegliche Unterstützung bedanken. Ich erfreute mich an einem optimal ausgestatteten Arbeitsplatz und einer sehr guten Arbeitsatmosphäre, an welcher das technische Personal zu großen Teilen beigetragen hat.

Hervorzuheben ist Dr. rer. nat. Philipp Arnold, welcher durch sein hervorragendes technisches Verständnis und durch kreative Denkanstöße wesentlich am Fortschritt dieser Arbeit beteiligt war.

Besonderer Dank gilt Frau Dr. rer. nat. Janna Schneppenheim für eine professionelle Betreuung meiner Versuche in freundschaftlichem Umgang. Frau Dr. rer. nat. Rielana Wichert danke ich für die Ratschläge zur Verfassung dieser Dissertation. Ebenso ist Frau Dr. rer. nat. Franka Scharfenberg zu erwähnen, welche mir half die Auswertung von bioinformatischen Informationen zu erlernen. Für eine außerordentliche Hilfsbereitschaft möchte ich mich außerdem bei Dr. rer. nat. Florian Peters, Dr. rer. nat. Anna Otte und Dr. rer. nat. Frederike Schmidt bedanken.

Im Anatomischen Institut bedanke ich mich bei Frau Gaby Steinkamp und Frau Monika Grell für eine exzellente Einführung in die Kultivierung primärer Zelllinien.

Bei Prof. Dr. Dr. h.c. Christian Haass und seiner Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Kooperation und die Überlassung mehrerer Arbeitsmaterialien.

Beim IRTG des SFB 877 und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) bedanke ich mich für eine großzügige finanzielle Unterstützung und ein weitreichendes Angebot an Weiterbildungsmöglichkeiten.



## 7.2 Curriculum vitae

<b>Name:</b>	Dennis Kristopher Berner
<b>Geburtsdatum:</b>	21.01.1987
<b>Geburtsort:</b>	Kiel
<b>Familienstand:</b>	Verheiratet mit Frau Maren Berner
<b>Staatsangehörigkeit:</b>	Deutsch
<b>Promotionsarbeit:</b>	
10/2016-10/2017	Stipendiat der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Anstellung in Vollzeit am Biochemischen Institut der CAU Kiel/AG Becker Pauly
<b>Studium:</b>	
2012-2019 11.2019	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel Approbation als Arzt
<b>Publikationen:</b>	Meprin beta cleaves TREM2 and controls its phagocytic activity on macrophages (Berner et al.) <u>EASEB J.</u> 2020 May;34(5):6675-6687. doi: 10.1096/fj.201902183R. Epub 2020 Apr 1.
<b>Anstellung:</b>	Assistenzarzt und Clinician Scientist der I. Medizin des UKSH Kiel